

Untersuchungen des
Einflusses von Aminocellulosen auf *Candida* Spezies
mithilfe der
Mikrotiterplattenlasernephelometrie und der Chemilumineszenz

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae
(Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Alexander Immanuel Schürmann
geboren am 21.06.1986 in Ulm-Söflingen

Gutachter

1. PD Dr. rer. nat. et. med. habil Uta-Christina Hipler (Dermatologie Uniklinik Jena)
2. Prof. Dr. med. Uwe Wollina (Dermatologie, Allergologie Krankenhaus Dresden-Friedrichstadt, Städtisches Klinikum TU Dresden)
3. Prof. Dr. med. Udo Markert (Plazentalabor Uniklinik Jena)

Tag der öffentlichen Verteidigung: 06.03.2017

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AC	Aminocellulose
ACS	Aminocellulosesulfat
AECS	6-Deoxy-6-(w-aminoethyl) amino cellulose-2,3(6)-O-sulfat
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
AMP	Adenosinmonophosphat
AGU	Anhydroglukoseeinheit
ATP	Adenosintriphosphat
ATCC	American Type Culture Collection
BAECS	6-Deoxy-6-(2-(bis-N',N'-(2-aminoethyl) aminoethyl)) amino cellulose-2,3(6)-O-sulfat
°C	Grad Celcius
CRP	C-Reaktives Protein
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DP _w	Weight average degree of polymerisation(Polymerisationsgrad)
DS _{Amin}	Degree of substitution of aminogroups bonded to cellulose backbone (Substitutionsgrad der Aminogruppen)
DS _{Tos}	Degree of substitution of Tosylgroups bonded to cellulose backbone (Substitutionsgrad der Tosylgruppen)
DS _{EDA}	Degree of substitution of Ethyldiamin bonded to cellulose backbone (Substitutionsgrad von Ethylendiamin)

Abkürzungsverzeichnis

EDA	Ethylendiamin
g	Gramm
h	Stunde
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
IC ₅₀	Inhibitorische Konzentration 50
KBE	Koloniebildende Einheiten
Konz.	Konzentration
LM	Luminometer
mg	Milligramm
mL	Milliliter
mm	Millimeter
μL	Mikroliter
NaCl	Natrium-Chlorid
NCAC	non <i>Candida albicans</i> <i>Candida</i>
MLN	Mikrotiterplatten-Lasernephelometrie
nM	Nanomolar
NNSI	National Nosokomial Infections Surveillance Systeme
MTP	Mikrotiterplatte
pH-Wert	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
RNU	Relative Nephelometric Units (Relative Nephelometer Einheiten)
SDA	Sabouraud-Dextrose-Agar
spp.	Spezies
SGB	Sabouraud-Glukose-Bouillon
Tab.	Tabelle
TC	Tosylcellulose
UV-Strahlung	Ultraviolette Strahlung

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Inhaltsverzeichnis	III
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	3
2.1 Die Suche nach neuen fungiziden Wirkstoffen	3
2.2 Der Hefepilz <i>Candida spp.</i>	5
2.2.1 Systematische Einordnung	5
2.2.2 Zellaufbau	7
2.2.3 Fortpflanzung	10
2.2.4 Virulenzfaktoren	11
2.2.5 Epidemiologie, Candidämie und Candidosen	15
2.2.6 Therapie von <i>Candida</i> -Infektionen	18
2.3 Aminocellulose	21
3 Ziele der Arbeit	24
4 Methodik	25
4.1 Materialien	25
4.2 Testsubstanzen	27
4.3 Kultivierung der Hefepilze	28
4.4 Versuchsdurchführung	28
4.5 Nephelometrie	29
4.6 Luminometrie	31
4.7 Überprüfung der antimykotischen Wirkung	33
5 Ergebnisse	34
5.1 Wachstum von <i>C. albicans</i> unter dem Einfluss von EDA-AC ₅₀	34
5.2 Wachstum von <i>C. albicans</i> unter dem Einfluss von EDA-AC ₁₁₁	35
5.3 Wachstum von <i>C. albicans</i> unter dem Einfluss von EDA-AC ₃₃₀	36
5.4 Wachstum von <i>C. albicans</i> unter dem Einfluss von EDA-AC ₄₅₄	38
5.5 Wachstum von <i>C. albicans</i> unter dem Einfluss von EDA-AC ₁₈₅₈	39
5.6 Wachstum von <i>C. glabrata</i> unter dem Einfluss von EDA-AC ₅₀	40
5.7 Wachstum von <i>C. glabrata</i> unter dem Einfluss von EDA-AC ₁₁₁	41
5.8 Wachstum von <i>C. glabrata</i> unter dem Einfluss von EDA-AC ₃₃₀	43

Inhaltsverzeichnis

5.9	Wachstum von <i>C. glabrata</i> unter dem Einfluss von EDA-AC ₄₅₄	44
5.10	Wachstum von <i>C. glabrata</i> unter dem Einfluss von EDA-AC ₁₈₅₈	45
5.11	Wachstum von <i>C. krusei</i> unter dem Einfluss von EDA-AC ₅₀	46
5.12	Wachstum von <i>C. krusei</i> unter dem Einfluss von EDA-AC ₁₁₁	47
5.13	Wachstum von <i>C. krusei</i> unter dem Einfluss von EDA-AC ₃₃₀	48
5.14	Wachstum von <i>C. krusei</i> unter dem Einfluss von EDA-AC ₄₅₄	49
5.15	Wachstum von <i>C. krusei</i> unter dem Einfluss von EDA-AC ₁₈₅₈	50
5.16	Vergleich der IC ₅₀ -Werte anhand der luminometrischen und nephelometrischen Untersuchungen	51
5.17	Überprüfung der antimykotischen Wirkung auf SDA-Platten	54
6	Diskussion	55
6.1	Antifungale Wirkung der Aminocellulosen auf die <i>Candida</i> Spezies <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> und <i>C. krusei</i>	55
6.2	Vergleich der IC ₅₀ -Werte	65
7	Schlussfolgerungen	71
8	Abbildungsverzeichnis	74
9	Tabellenverzeichnis	77
10	Literaturverzeichnis	79
11	Anhang	89
11.1	Lebenslauf	89
11.2	Danksagung	91
11.4	Ehrenwörtliche Erklärung	92

1 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit untersucht die antimykotische Wirkung von Aminocellulosen (AC) auf die klinisch relevanten pathogenen Hefepilze *C. albicans* DSM 1386, *C. glabrata* DSM 11226 und *C. krusei* ATCC 6258. Hierzu wurden fünf verschiedene AC untersucht. Diese unterschieden sich hinsichtlich der Ausgangscellulose und deren jeweiligen Polymerisationsgrad ($DP_w = 50 - 1858$), sowie im Grad der Substituierung mit Ethylendiamin ($DS_{EDA} = 0,695 - 0,973$). Ausgehend von den Stammlösungen wurden Verdünnungsreihen von den AC hergestellt und für 24 h mit den Hefepilzen *C. albicans* DSM 1386, *C. glabrata* DSM 11226 und *C. krusei* ATCC 6258 inkubiert. Über diesen Zeitraum wurden stündlich die Trübungswerte der Suspensionen mit einem Mikrotiterplatten-Lasernephelometer (MLN) aufgenommen und mit diesen Werten Wachstumskurven erstellt. Die Nephelometrie basiert auf der Messung des nach vorn gestreuten Lichts. Im Fall der MLN wird durch die Partikel in der Suspension das Licht eines Lasers gestreut und gelangt auf einen Photomultiplier oder auf eine Photodiode. Die Menge des gestreuten Lichts ist linear zur Partikelanzahl bzw. der Hefezellen in der Suspension. Im Anschluss erfolgte die Bestimmung metabolisch aktiver Hefezellen mittels ATP-Biolumineszenz-Assay, dem BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay. Die in dieser Arbeit angewandte Chemilumineszenz misst die Lichtemission einer ATP-abhängigen enzymatischen Reaktion.

Anhand der Ergebnisse von beiden Methoden wurden die AC-Konzentrationen berechnet, bei denen 50% der Mikroorganismen in ihrem Wachstum gehemmt wurden. Die Werte, die sich hieraus ergeben, werden als IC_{50} bezeichnet und wurden zum Vergleich beider Methoden miteinander verwendet. Ferner ergibt sich durch die Verwendung von IC_{50} in $\mu\text{g/mL}$ eine gute Vergleichbarkeit der Hemmkonzentrationen von AC mit denen anderer Wissenschaftlicher Arbeiten, welche sich mit AC als antimikrobielles Agens beschäftigen. Zusätzlich erfolgte eine Überprüfung auf fungizide bzw. fungistatische Wirkung bestimmter AC-Konzentrationen, bei denen eine Hemmung des mikrobiellen Wachstums beobachtet worden war. Zu diesem Zweck wurden die entsprechenden Proben auf Sabouraud-Glukose-Agarplatten ausplattiert und die Kolonienbildung nach 24-stündiger Inkubation ausgewertet.

Zusammenfassung

Alle untersuchten AC wiesen, in Abhängigkeit der verwendeten AC-Konzentration, wachstumshemmende Effekte auf die *Candida spp.* auf. In den meisten Fällen konnte nach der Überimpfung auf Agarplatten eine vollständige Hemmung des Hefenwachstums bei AC-Konzentrationen zwischen 625 µg/mL und 2500 µg/mL nachgewiesen werden. EDA-AC₅₀ und EDA-AC₁₁₁ hemmten das Wachstum von *Candida spp.* am effektivsten (IC₅₀-LM 144,55 µg/mL – 226,4 µg/mL). Mit EDA-AC₃₃₀ konnte eine effektive Hemmung von *C. krusei* erreicht werden (IC₅₀-LM 170,1 µg/mL). Die ineffektivste Hemmung zeigte EDA-AC₁₈₅₈ auf *C. albicans* (IC₅₀-LM 625,55 µg/mL). EDA-AC₄₅₄ konnte ebenfalls erst in höheren Konzentrationen eine inhibitorische Wirkung auf *Candida spp.* entfalten (IC₅₀-LM 352,8 µg/mL – 592,1 µg/mL). Die AC mit den Polymerisationsgraden DP_w = 330 und DP_w = 1858 konnten ihre inhibitorische Wirkung auf *C. glabrata* und *C. krusei* in mittleren Konzentrationsbereichen von 285,2 µg/mL bis 321,1 µg/mL (IC₅₀-LM) entfalten.

Die luminometrisch erhobenen Hemmkonzentrationen waren im Vergleich mit der Überprüfung auf Fungizität bzw. Fungistase übereinstimmend. Eine komplette Wachstums- hemmung der Hefepilze stellte sich zwischen 625 µg/mL und 1250 µg/mL, selten auch schon ab 313 µg/mL, ein.

Die wachstumshemmenden AC Konzentrationen die mithilfe der Mikrotiterplattenlaser- nephelometrie bestimmt wurden, lagen zwischen 39 µg/mL bis 625 µg/mL.

AC mit einem DP_w zwischen 50 und 111 zeigten effektivere wachstumshemmende Eigen- schaften, als AC mit höherem DP_w. Gleichzeitig besaßen diese AC den höchsten Substitu- tionsgrad (DS_{EDA} = 0,971 bzw. 0,973). EDA-AC₃₃₀ zeigte mit einem niedrigen DP_w und dem geringsten Substitutionsgrad (DS_{EDA} = 0,695), die effektivste Hemmung nach EDA- AC₅₀ und EDA-AC₁₁₁. EDA-AC₄₅₄ und EDA-AC₁₈₅₈ wiesen hohe DP_w auf, sowie Substi- tutionsgrade im mittleren Bereich (DS_{EDA} = 0,767 bzw. 0,886). Die inhibitorische Wirkung beider AC war im Vergleich zu den anderen AC geringer.

2 Einleitung

2.1 Die Suche nach neuen fungiziden Wirkstoffen

Die Aufklärung antimikrobieller Mechanismen, mit dem Ziel der Optimierung der Therapie von Infektionskrankheiten, stellt auch circa 120 Jahre nach der Entdeckung der Antibiotika, eine immense Herausforderung dar. Die Verbesserung der Hygienemaßnahmen und der Kampf gegen mikrobielle Infektionserreger rückte ab der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts in den Mittelpunkt der medizinischen Forschung. Verschiedenen Elementen und Verbindungen wurden im Laufe der Zeit heilende Wirkungen zugesprochen, ohne oftmals den eigentlichen Wirkmechanismus gekannt zu haben. Die Entdeckung der Photometrie machte die Quantifizierung der Wirkstärke mithilfe der optischen Dichte möglich. Durch die Anfertigung von Wachstumskurven ließ sich der Einfluss solcher Elemente und Verbindungen ermitteln, dies war jedoch sehr aufwändig.

Ein weiteres Verfahren, das zur Quantifizierung der Wirkstärke angewandt werden kann, ist die Nephelometrie. Es handelt sich um ein optisches Verfahren, bei welchem das rote Licht (635 nm) eines Lasers durch die Wells einer Mikrotiterplatte geleitet wird. Im Unterschied zur Photometrie wird nicht die Extinktion von Licht, sondern das nach vorn gestreute Licht, mittels Photodiode oder Photomultiplier gesammelt und gemessen. Die Intensität des gestreuten Lichts stellt eine Funktion der Partikelkonzentration dar. Eine Proportionalität besteht ebenfalls zwischen der Intensität des gestreuten Lichts und der Zelldichte (Joubert, Calmes et al. 2010).

Erste nephelometrische Messungen zur Bestimmung der ungefähren Anzahl von Hefezellen in Suspension wurden 1927 von G. L. Peskett durchgeführt. Er verglich die Trübung von Hefesuspensionen mit Standard Suspensionen auf Bariumsulfatbasis. Schon damals beschrieb Peskett das Verfahren als schnelle, günstige, einigermaßen genau und auf einfacher Technik beruhende Methode, um das Wachstum von Hefen zu quantifizieren und während der Wachstumsphase zu beobachten (Peskett 1927).

Bisherige Applikationen sind Löslichkeitstests zur Bestimmung von Löslichkeitsverhalten, Protein- bzw. Immunpräzipitationen in der klinischen Chemie, sowie Quantifizierung von Makromolekülen, beispielsweise im Rahmen von Polymerisationsreaktionen. Ein neuer Anwendungsbereich ist das Monitoring des Wachstums von Mikroorganismen (Hipler, Brand et al. 2003).

Bevan und Lloyd beschrieben im Jahr 2000 die Lasernephelometrie als geeignete Methode für ein Hochdurchsatz-Screening zur Identifizierung der Wasserlöslichkeit von Stoffen, Löslichkeitspunkten und damit besserer Selektierbarkeit von Wirkstoffen und Wirkstoffverbindungen für die pharmazeutische Industrie. Sie konnte Stärken und Schwächen dieses Systems aufdecken (Bevan und Lloyd 2000).

Im Gegensatz zu aktuellen Standardmethoden wie der radialen Wachstumsmessung auf soliden Medien liegen die Vorteile der Nephelometrie in der Geschwindigkeit und der einfachen Handhabung. Eine große Anzahl von Proben, bei einer Verringerung der benötigten Substanzmenge und computergesteuerte Verarbeitung machen diese Verfahren wertvoll (Joubert, Calmes et al. 2010).

In früheren Studien konnte mithilfe der MLN die Wirksamkeit von antimikrobiellen Substanzen auf verschiedene pathogene Mikroorganismen in Abhängigkeit von der Konzentration dargestellt werden (Seyfarth, Schliemann et al. 2008).

Die Suche nach neuen fungiziden Wirkstoffen findet ihre Relevanz im Anstieg der Pilzinfektionen besonders im klinischen Bereich. Der üppige Einsatz von Breitbandantibiotika und der Gebrauch von immunsuppressiven Therapeutika erleichtern u.a. pathogenen Hefen den Eintritt in den menschlichen Organismus. Durch die antimikrobielle Wirkung von Antibiotika werden neben pathogenen Keimen auch kommensale Mikroorganismen eliminiert, welche unter physiologischen Bedingungen eine Barrierefunktion gegenüber Krankheitserregern ausüben, indem sie Haut und Schleimhaut besiedeln. Die Schwächung dieser Barrierefunktion ermöglicht es den Hefen, sich zu etablieren. Tatsächlich wurde in den letzten zwei Dekaden ein Anstieg von Septikämien beobachtet, verursacht durch v.a. *Candida spp.*. Die Candidämie stellt den Großteil der nosokomialen *Candida*-Infektionen dar (Pfaller, Messer et al. 1998). Die aktuell praktizierte Anwendung von Antimykotika führt zur Ausbildung von Resistenzen und damit u.a. zu einer Verschlechterung der Behandlungsmöglichkeiten bei immungeschwächten Patienten. Zur Umgehung dieser Resistenzbildung bei Hefen ist die kontinuierliche Suche und Erforschung von neuen antimykotisch wirkenden Substanzen erforderlich (White, Marr et al. 1998). Hier leistet die vorliegende Arbeit einen wertvollen Beitrag, in dem sie mit einer anerkannten Maßnahme, wirtschaftlichen Methodik eine Reihe von Substanzen (AC) auf ihre antimykotische Wirkung untersucht.

2.2 Der Hefepilz *Candida* spp.

2.2.1 Systematische Einordnung

Neben Pflanzen und Tieren werden auch Pilze zu den Eukaryoten gezählt, da sie wie diese einen echten Zellkern besitzen. Die Einteilung der Pilze nach klinischen Gesichtspunkten erfolgt gemäß dem „DHS-System“ nach Riecht. „DHS“ steht für Dermatophyten (Fadenpilze), Hefen (Sprosspilze), Schimmelpilze und dimorphe Pilze (Hof und Dörries 2014). Im Gegensatz zu Dermatophyten können Hefen und Schimmelpilze Schleimhaut- und Systemmykosen auslösen (Bodenschatz 2006).

Die Zugehörigkeit eines Pilzstammes zu einer dieser Gruppen lässt wichtige Schlussfolgerungen für Ätiologie, Epidemiologie und Therapie ableiten (Seebacher und Hellmessen 1990).

Entsprechend der systematischen Einordnung wird die Gattung *Candida*, innerhalb der Echten Pilze (Eumycota), zu der Abteilung der Ascomycota (Schlauchpilze) und hier zur Ordnung der Echten Hefen (Saccharomycetales) gezählt (Tab. 1). Innerhalb der Gattung *Candida* gibt es, neben 15 klinisch relevanten pathogenen Arten, mehr als 150 weitere Vertreter, die infektiologisch betrachtet eine untergeordnete Rolle einnehmen. *C. albicans*, *C. glabrata* und *C. krusei*, welche in dieser Arbeit untersucht wurden, gehören zu den klinisch relevanten, fakultativ pathogenen Spezies (Yapar 2014).

Tab. 1 Systematik der Pilze, Einordnung *Candida* (Dörfelt und Jetschke 2001)

IX. Abteilung	Eumycota (Echte Pilze)
2. Unterabteilung	Ascomycotina
1. Klasse	Ascomycetes (Schlauchpilze)
1. Unterklasse	Endomycetidae
1. Ordnung	Saccharomycetales
Familie	Saccharomycetaceae
Gattung	<i>Candida</i>

Nahezu alle *Candida* Spezies, außer *C. glabrata* und *C. krusei*, gehören einer einzigen Klade (geschlossene Abstammungsgemeinschaft) an. Charakteristisch für diese Klade ist, dass das CUG Codon eher zu Serin als zu Leucin translatiert wird. Innerhalb der *Candida*

Einleitung

Klade kann weiterhin zwischen diploiden und haploiden Arten unterschieden werden. *C. glabrata* hingegen steht in seiner Verwandtschaftsbeziehung *S. cerevisiae*, der Bierhefe, nahe (Bennett 2010) (Abb. 2.1).

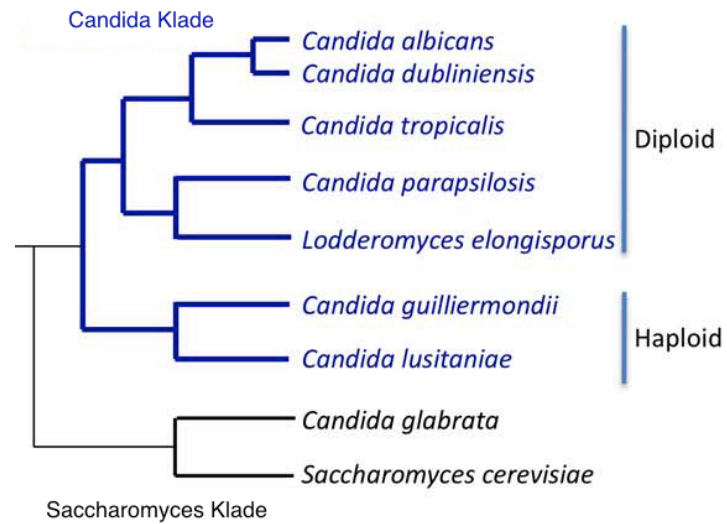


Abb. 2.1 Phylogenetik *Candida* (Bennett 2010).

2.2.2 Zellaufbau

Die Eumycota, zu denen *Candida* zählt, grenzen sich von der Umwelt durch eine Zellwand ab, deren Hauptbestandteile Chitin, Glukan, Mannan und Ergosterin sind (Hof und Dörries 2009). Während Glukan und Chitin keine antigenen Eigenschaften besitzen, sind Mannane immunogen. Sie vermitteln die Adhärenz der Pilzzelle an Epi- und Endothelien, sowie an Plastikmaterialien. Diese Eigenschaft stellt einen wichtigen Pathogenitätsfaktor dar. Die Oberflächenbeschaffenheit verleiht der Zellwand von *Candida* einen anionischen Charakter (Horisberger und Clerc 1988).

Ähnlich, wie bei Zellen höher entwickelter Organismen, enthält *Candida* Organellen, wie Mitochondrien, Ribosomen, einen Golgi-Apparat und Peroxisomen. *Candida* besitzt, wie alle anderen Eukaryoten auch, einen echten Zellkern mit einer Kernmembran, einem Nucleolus und Chromatin, welches sich während der Teilung zu Chromosomen kondensiert (Hahn, Falke et al. 2004). Die Art *C. albicans* verfügt z.B. über einen diploiden heterozygoten Chromosomensatz. Das Genom besteht aus etwa 2 x 16 Megabasenpaaren, welche sich auf 2 x 8 Chromosomen aufteilen (Chibana, Oka et al. 2005). *C. krusei* und *C. glabrata* besitzen hingegen nur 8 bzw. 14 Chromosomen (Doi, Homma et al. 1992).

C. albicans (Abb. 2.2) und *C. krusei* (Abb. 2.4) besitzen einen ähnlichen morphologischen Aufbau (Anaissie, McGinnis et al. 2009). Beide bilden Blastosporen, Pseudomyzel und Hypen aus. *C. albicans* kann im Gegensatz zu *C. krusei* und *C. glabrata*, vor allem auf soliden Nährmedien wie Reisagar, endständige Chlamydosporen (doppelwandige Überdauerungsformen) ausbilden (Staib und Morschhauser 2007). *C. glabrata* hingegen wächst nicht polymorph und bildet nur Blastosporen aus (Abb. 2.3) (Silva, Negri et al. 2012).

Einleitung

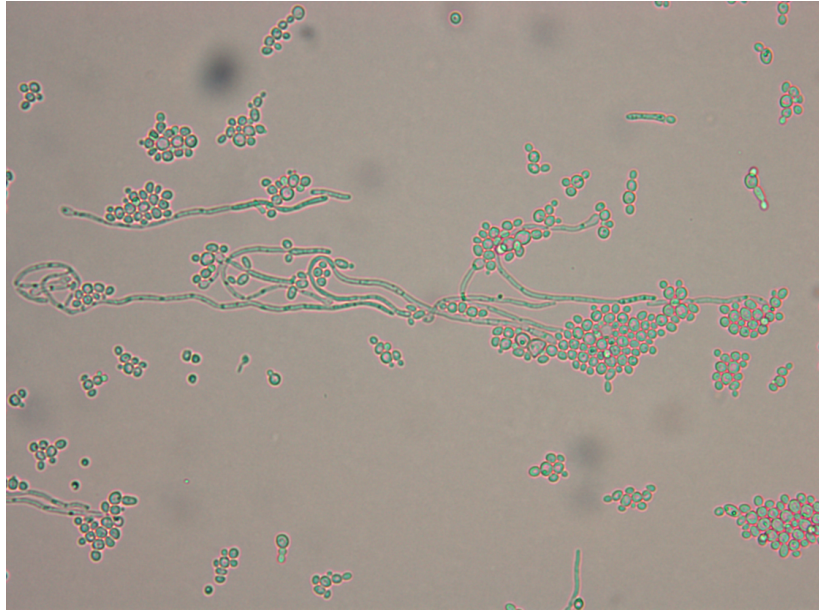


Abb. 2.2 Mikromorphologie von *C. albicans*. Es sind Sprosszellen, Myzel und doppelwandige Chlamydosporen zu erkennen (Dermatologie Jena).

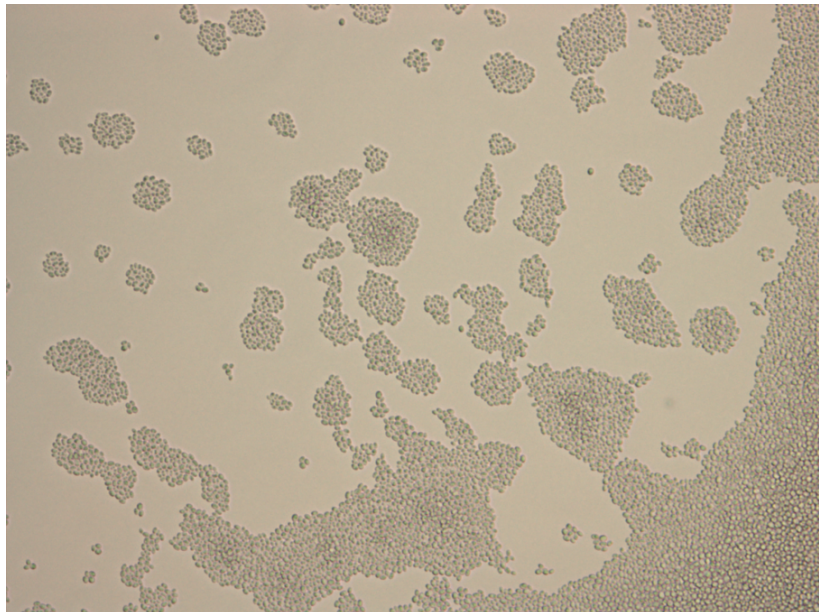


Abb. 2.3 Blastosporen von *C. glabrata* (Dermatologie Jena).

Einleitung



Abb. 2.4 Blastosporen und Pseudohyphe von *C. krusei* (Dermatologie Jena).

2.2.3 Fortpflanzung

Die Fortpflanzung kann asexuell, sexuell bzw. parasexuell stattfinden. Die einfachste Form der Fortpflanzung, die Mitose, geschieht durch Aussprossung der Blastosporen aus der Mutterzelle. Eine Kopie des Zellkerns wandert in die Blastospore ein, die Tochterzelle wächst heran und nabelt sich ab. Unter geeigneten Bedingungen können sich Keimschläuche entwickeln, d.h. Tochterzelle und Mutterzelle bleiben miteinander verbunden, und es kommt zur Ausbildung von Pseudohyphen. Diese länglichen Gebilde sind nicht durch ein Septum von der Mutterzelle getrennt, wie echte Hyphen. Echte Hyphen bilden mit mehreren Pilzzellen einen Verband, sie ergeben in ihrer Gesamtheit das Myzel; und es dient der Nährstoffaufnahme sowie der Vermehrung (Hof und Dörries 2014).

Bislang zählten *Candida spp.* zu den Fungi imperfecti. Neuere Forschungen geben Hinweise darauf, dass eine geschlechtliche Fortpflanzung möglich ist und dies sogar zwischen gleichgeschlechtlichen Pilzzellen. Diese sog. parasexuelle Fortpflanzung ist bei *C. albicans* auf heterothallischem und homothallischem Wege möglich. Es kommt zu einer Fortpflanzung ohne Meiose oder zwischen Geschlechtszellen der a- und α -Stämme (heterothallisch) oder zwischen a-Stämmen (homothallisch) durch Verschmelzung zu einer tetraploiden Zelle (Bennett 2010) (Abb. 2.5).

Weitere Vertreter der Spezies *Candida*, wie *C. tropicalis* und *C. dubliniensis* können sich geschlechtlich fortpflanzen. Bei *C. glabrata* und *C. parapsilosis* wird aufgrund ähnlicher Gen-Loci und Transkriptionsfaktoren diese Fähigkeit vermutet (Bennett und Johnson 2005, Logue, Wong et al. 2005, Bennett 2010, Porman, Alby et al. 2011)

Parasexueller Zyklus *C. albicans*

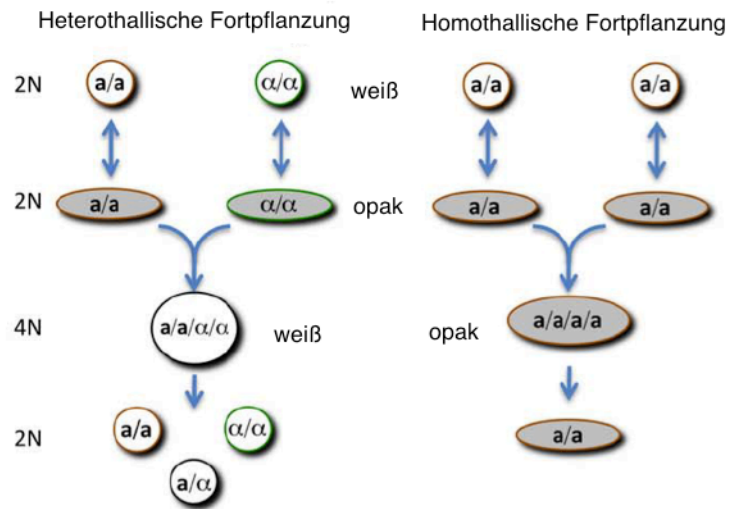


Abb. 2.5 Parasexueller Fortpflanzungszyklus von *C. albicans* zwischen gleichgeschlechtlichen und ungleichgeschlechtlichen Zelltypen. a und α beschreiben unterschiedliche Geschlechtstypen (Bennett 2010).

2.2.4 Virulenzfaktoren

Candida spp. sind fakultativ pathogen, eine klinisch relevante Erkrankung entsteht nur unter bestimmten Bedingungen. Ausschlaggebend sind Faktoren, wie eine, z.B. durch die Gabe von Breitband-Antibiotika, zerstörte Bakterienflora auf Epithelien, eine Änderung des physiologischen pH-Werts der Haut, Barrierschäden der Haut, der Immunstatus des Patienten, sowie Stoffwechselentgleisungen (Diabetes mellitus). Die Fähigkeiten von *Candida*, den Wirt zu infiltrieren und sich zu einem Pathogen zu entwickeln, sind vielfältig (Hube 2004).

Voraussetzungen, um im menschlichen Wirt oder auf Medizinprodukten zu kolonisieren, ist die Adhäsionsfähigkeit von *Candida* auf Oberflächen. Zunächst findet eine unspezifische Anheftung auf Oberflächen über hydrophobe und elektrostatische Kräfte statt (Li, Yan et al. 2003). Dieser Vorgang wird gefördert über Adhäsine, die an Aminosäuren, Zucker oder auch an abiotische Oberflächen binden können (Verstrepen und Klis 2006). Ist dies erreicht, kann sich *Candida* aus einem reichhaltigen Repertoire, wie die Bildung eines Biofilms, der Sekretion von hydrolytischen Enzymen (Proteasen, Phospholipasen und Haemolysin), und speziellen Effluxpumpen bedienen (Sardi, Scorzoni et al. 2013).

Ein mikrobiologisch faszinierender und dem Kliniker Sorgen bereitender Mechanismus, ist die Bildung eines Biofilms durch *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* oder *C. parapsilosis* (Abb. 2.6). Sie sind in der Lage viele implantierbare Materialien, wie z. B. Verweilkatheter zu überwuchern. Dieser Biofilm trägt im menschlichen Wirt wesentlich zur Mortalität immungeschwächter, hospitalisierter Patienten bei. Biofilmzellen sind häufig schwer zu eradizieren. Sie zeichnen sich durch eine besondere Resistenz gegenüber antifungalen Therapien aus. Antimykotische Stoffe gelangen nicht an ihren Wirkungsort aufgrund der Barrierefunktion des Biofilms. Zudem weisen Biofilme ausgezeichnete adhäsive Eigenschaften auf. Wiederkehrende *Candida*-Infektionen sind die Folge (Cuellar-Cruz, Vega-Gonzalez et al. 2012). In einer indischen Studie konnte eine verstärkte Fähigkeit von Biofilmbildung bei HIV-positiven Patienten signifikant nachgewiesen werden. Nicht *C. albicans* *Candida* (NCAC) übertrafen die *C. albicans* Isolate bei der Biofilmbildung in ihrer Intensität (Mane, Kulkarni et al. 2013). Entscheidend für die Formierung von Biofilmen ist die dimorphe Eigenschaft von *Candida*: nur in der hyphalen Wachstumsform ist die Bildung eines dichten homogenen Biofilmes möglich (Baillie und Douglas 1999).

Eine weitere Entdeckung bezüglich der Virulenzfaktoren sind die bereits erwähnten zellwandassoziierten Mannan-Verbindungen. Jede *Candida* Spezies verfügt über eine speziesspezifische Mannanstruktur, die durch verschiedene Mannosyltransferasen synthetisiert werden. Diese Mannooligosaccharide wirken zum einen als starkes Antigen, da sie vom angeborenen (unspezifischen) Immunsystem erkannt werden, und zum anderen sind sie beteiligt bei der Adhäsion an epithelialen Zellen. Über diesen Mechanismus kann eine Kolonisierung leicht stattfinden, und dies bildet den ersten Schritt für eine *Candida*-Infektion (Shibata, Kobayashi et al. 2012).

Bei einer Untersuchung von bestimmten Hitzeschockproteinen (Small Heatshock Proteins, Hsp21) in *C. albicans* konnte die Virulenz dieser Proteine festgestellt werden. Sie sorgen für invasives Wachstum und die Ausbildung suffizienter Filamente. Mutanten, die kein Hsp21 exprimieren, sind weniger in der Lage Epithelzellen und Endothelzellen zu zerstören und verlieren die Resistenz gegenüber humanen neutrophilen Granulozyten (Mayer, Wilson et al. 2012). Auch verschiedene Plasmamembran-Proteine besitzen Virulenzfunktionen, wie z.B. Sur7, ein Bestandteil eines integralen Membranproteins. Die in einer Studie beschriebene Mutante, ohne diese Proteinsubdomäne, zeigte gesteigerte Empfindlichkeit gegenüber einer Reihe von Oxidantien (z.B. H₂O₂) und Kupfer. Ein verringertes Wachs-

tum in Phagosomen von Macrophagen war die Folge. Die Fähigkeit eine Infektion einzuleiten, war vermindert. Mit diesen Erkenntnissen, über die Wichtigkeit von Membranproteinen für die Virulenz von Pathogenen, kann nach therapeutischen Ansatzpunkten geforscht werden (Douglas, Wang et al. 2012).

Die Umgebung, in der die Hefe wächst, hat entscheidenden Einfluss auf die Ausbildung von Virulenzfaktoren. Bei der Anzucht in kohlenstoffreichen Nährmedien konnte z.B. eine Umstrukturierung der Zellwand beobachtet werden. Durch Adaption des Zellwand-Proteoms und des Sekretoms stieg die Resistenz gegenüber Stressfaktoren und antimykotischen Medikamenten. Es wurde auch eine erhöhte Adhärenz und Biofilmbildung beschrieben (Ene, Heilmann et al. 2012). Die in einem Mausmodell beschriebene Phosphatlimitierung führte bei *C. albicans*-infizierten Mäusen zum Tode. Durch eine Veränderung des Phänotyps entstanden aggressive pathogene Eigenschaften. Mit dieser Studie konnte eine Anpassung des Pathogens auf einen Nährstoffmangel verdeutlicht werden, wie er auch bei schwer kranken Patienten mit Candidiasis im Darm vorkommen kann (Romanowski, Zaborin et al. 2012).

Die Invasion von *C. albicans* über Epithelzellen kann neben induzierter Endozytose, auch über die aktive Penetration mithilfe von lytischen Enzymen, wie Phospholipasen und Proteasen, welche vom Pathogen sezerniert werden, stattfinden (Zhu und Filler 2010) (Abb. 2.7). Fehlt durch gezielte Mutation einem *Candida* Stamm die Fähigkeit Phospholipase zu transkribieren, ist auch die Virulenz des Stammes abgedämpft (Ghannoum 2000) (Abb. 2.8). Die aktive Penetration geht mit einem signifikanten Zellschaden der epithelialen Zellen einher (Zhu und Filler 2010).

Einleitung

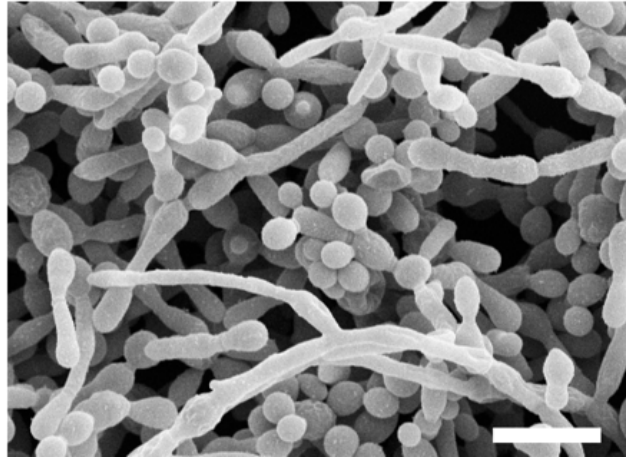


Abb. 2.6 Elektronenmikroskopisches Bild eines *C. albicans* Biofilms (Ramage, Saville et al. 2005).

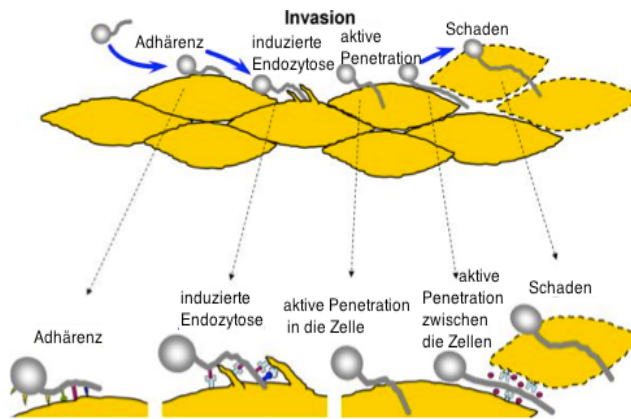


Abb. 2.7 Mechanismus der Invasion von *C. albicans* in epitheliale Zellen (Zhu und Filler 2010).

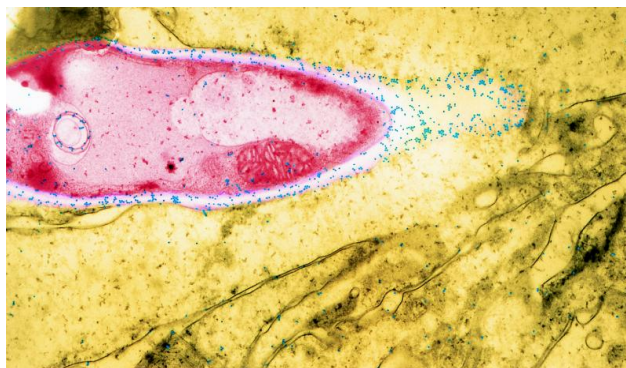


Abb. 2.8 Expression von Phospholipase B während einer *Candida*-Infektion im Gastrointestinaltrakt einer Maus (Ghannoum 2000).

2.2.5 Epidemiologie, Candidämie und Candidosen

Das Wissen um epidemiologische Daten und Risikofaktoren ist ein notwendiger Bestandteil zur Identifizierung von Risikogruppen. Frühzeitige intensivisierte Diagnostik, die Prophylaxe und empirische, sowie präventive Therapien ermöglichen die Einleitung einer Behandlung, bevor das Fortschreiten einer Infektion durch therapeutische Mittel nicht mehr zu beherrschen ist (Arendrup 2013).

Aufgrund des rasanten medizinischen Fortschritts in der medikamentösen und chirurgischen Therapie, kann das Leben schwer kranker Menschen, für die es noch vor wenigen Jahren keine Therapiemöglichkeit gab, verlängert werden. Therapieoptionen, wie Organtransplantation bei Organversagen, Chemotherapie bei Krebskranken und AIDS Patienten, sowie die Knochenmarkstransplantation in der Leukämietherapie sind fester Bestandteil der modernen Medizin. Aus den genannten und weiteren Behandlungsmöglichkeiten resultiert eine Patientenpopulation, deren Immunabwehr geschwächt ist und damit eine besondere Anfälligkeit für nosokomiale Keime, wie *Candida* Spezies aufweist (Pfaller und Diekema 2007). Ein Großteil des Patientenkontingents, welches an Candidämien erkrankt, rekrutiert sich nach internationalen Studien aus intensivmedizinischen, sowie chirurgischen Patienten. Patienten mit zentralem Venenkatheter, parenteraler Ernährung, Organtumoren oder hämatologischen malignen Erkrankungen stellen des Weiteren eine große, vulnerable Patientenpopulation dar (Arendrup 2013).

Die Häufigkeit der Candidämien reicht von 1,2 bis 25 Fällen auf 100.000 Einwohner oder 0,19 bis 2,5 diagnostisch gesicherten Einweisungen auf 1000 klinischen Einweisungen. Die große Variabilität dieser Zahlen ergibt sich aus dem unterschiedlichen Aufbau der Untersuchungen, aus denen epidemiologische Daten gewonnen werden (Arendrup 2013).

In den vergangenen Jahren stieg neben Infektionen, verursacht durch den Schimmelpilz *Aspergillus fumigatus*, auch die Infektionsrate für *Candida* Spezies dramatisch an. Die schwer zu diagnostizierende Infektion geht mit einer hohen Morbidität, sowie mit einer hohen Mortalität, trotz Therapiemöglichkeiten, einher (Perlroth, Choi et al. 2007). Mehr als 90% der invasiven *Candida*-Infektionen werden von *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* und *C. krusei* verursacht. In den USA ist *Candida* der viert häufigste Grund für eine nosokomiale Infektion des Blutkreislaufes, dies sind etwa 8 – 10% aller nosokomialen Infektionen des Blutkreislaufes (Pfaller und Diekema 2007).

Zwischen 1990 und 2010 sanken, die durch *C. albicans* verursachten, invasiven Candidämien weltweit von 65% auf 44%. Jedoch kam es gleichzeitig zu einem deutlichen Anstieg der Infektionen mit anderen *Candida* Spezies, wie *C. tropicalis* und *C. parapsilosis*. In Europa und Nordamerika wurden die abnehmenden, von *C. albicans* verursachten invasiven Candidämien, vor allem durch *C. glabrata* ersetzt. In Lateinamerika ist *C. albicans*, gefolgt von *C. parapsilosis*, der am häufigsten isolierte Erreger.

In Europa verursachen *C. glabrata* und *C. parapsilosis* je 14%, *C. tropicalis* 7% und *C. krusei* 2% der Candidämien (Tortorano, Kibbler et al. 2006). Die geschätzte Gesamtmortalität aufgrund von invasiver Candidämie liegt zwischen 40% und 60%.

Der Immunstatus des Patienten hat ebenfalls einen Einfluss auf die Mortalität (Almirante, Rodriguez et al. 2005, Colombo, Guimaraes et al. 2007). In einer spanischen Studie betrug die Mortalität bei 345 Fällen von Candidämie 44%. Die Mortalitätsraten der relevanten Spezies im Einzelnen betrugen für *C. albicans* 51%, für *C. parapsilosis* 23%, für *C. tropicalis* 10%, für *C. glabrata* 8% und für *C. krusei* 4% (Almirante, Rodriguez et al. 2005).

Der Hauptgrund für die Veränderung der Speziesverteilung wird mit der Einführung der Verwendung von Fluconazol und der vermehrten Benutzung von Verweilkathetern angegeben (Yapar 2014).

Die verschiedenen *Candida* Arten bevorzugen unterschiedliche Patientengruppen. *C. albicans* ist häufig für Infektionen der Haut, des Oropharynx, dem unteren Respirationstrakt, dem Gastrointestinaltrakt, sowie des urogenitalen Systems verantwortlich und bleibt häufigster Grund für eine Candidämie. *C. glabrata* ist eher bei älteren Menschen und Patienten mit Neoplasien zu finden, es besteht zudem eine Assoziation mit der Gabe von Fluconazol. Neutropenische Leukämiepatienten, sowie Patienten nach Stammzelltransplantationen sind hingegen eher prädestiniert für eine Infektion mit *C. krusei* (Yapar 2014).

C. albicans ist für 50 – 70% der invasiven *Candida*-Infektionen verantwortlich (Arendrup 2010). Als Bestandteil der Schleimhaut des gesunden Menschen führt *C. albicans* bei immunkompetenten Personen i.d.R. nicht zum Ausbruch einer Pilzerkrankung. Der Übergang in ein pathogenes Verhalten hat verschiedene Ursachen und geht jedoch zumeist mit einer erniedrigten Immunkompetenz einher. Die Pathogenese ist in einer Veränderung des genetischen Expressionsmusters erkennbar (Bennett und Johnson 2005).

Die hohe Adaptionfähigkeit an verschiedene Umgebungen und Milieus eines befallenen Organismus macht *C. albicans* zu einem der erfolgreichsten Erreger seiner Spezies (Kim und Sudbery 2011). Die Veränderung des Transkriptionsprofils führt beispielsweise zu einer verstärkten Ausbildung von Hyphen („Yeast-Hyphal-Transition“), die zu einer verstärkten Anheftung und Penetration des Gewebes führt (Hube 2004). Eine weitere Fähigkeit, die bis vor kurzem einzig *C. albicans* zugesprochen wurde, ist die Veränderung seines Phänotyps von sogenannten Weißen- zu Opaque-Zellen. Dieser „Phenotypic Switch“ hat unter bestimmten Bedingungen einen begünstigenden Einfluss auf die sexuelle Reproduktion. Die Folge ist eine gesteigerte Virulenz durch rekombinante Nachfahren. Durch Spezialisierung wie diese, findet die Hefe einen Überlebensvorteil in einer sonst eher feindlichen Umgebung, wie in einem Wirt (Bennett und Johnson 2005, Bennett 2010).

Weiterhin übertrifft *C. albicans* in seiner Häufigkeit die Häufigkeit der NCAC, jedoch nehmen diese zu. Unter den NCAC ist *C. glabrata* vorherrschend und wird häufig bei organtransplantierten Patienten, Tumorpatienten oder Patienten, welche zuvor mit Azolen oder Echinocandinen therapiert wurden, isoliert (Pfaller, Andes et al. 2014).

Candidosen der Haut werden in interdigitale und intertriginöse Candidosen unterschieden. Weitere Formen sind die Onychomykose und die Balanoposthitis. Die intertriginöse Candidose bezeichnet die Stellen, an denen Haut auf Haut trifft, dort liegt ein feuchtwarmes Milieu vor, welches ideal für das Wachstum von *Candida* ist. Häufig ist sie ein Zeichen für einen noch unentdeckten Diabetes mellitus. Weitere Candidosen der Haut sind die chronische mukokutane Candidose, die sich durch Therapieresistenz auszeichnet, die Candidosis genito-glutealis infantum, sowie die seltene, tiefere Hautschichten betreffende, Folliculitis barbae candidomycetica (Abeck, Brasch et al. 2005).

Die Orale Candidose (mukokutan) kommt bei immungeschwächten Patienten oder Neugeborenen vor. Es wird zwischen der akuten oropharyngealen Candidose mit abstreifbaren weißen Belägen auf der Mukosa und der erythematösen Candidose unterschieden, die sich durch nicht abstreifbare gerötete Mukosabereiche und teils auch durch Ödeme auszeichnet (Abeck, Brasch et al. 2008).

Häufige und gefährliche invasive Formen sind, neben der Candidämie, die osteoarticuläre *Candida*-Infektion, die Candidiasis des kardiovaskulären Systems, sowie des zentralen Nervensystems und der Befall des Ösophagus (Pappas, Kauffman et al. 2009).

Ebenfalls häufig, jedoch weniger lebensbedrohlich bei immunkompetenten und bei Symptomfreiheit nicht zwingend zu therapieren, sind die vulvovaginale Candidose und der durch *Candida* ausgelöste Harnwegsinfekt (Achkar und Fries 2010, Mylonas, Mendling et al. 2013)

2.2.6 Therapie von *Candida*-Infektionen

Mykosen können oberflächlich (mukokutan), als invasive Candidiasis oder als systemische Candidämien auftreten und müssen entsprechend therapiert werden. Eine Infektion ist praktisch im gesamten Körper möglich. Eine Behandlung kann durch den Einsatz verschiedener topisch oder systemisch wirkender Antimykotika erfolgen.

Die Wirkung von Antimykotika wird in fungizid oder fungistatisch unterteilt. Eine fungizide Wirkung beschreibt eine Abtötung der Pilzzellen, während bei einer fungistatischen Wirkung lediglich das Wachstum der Pilze eingeschränkt wird. Antimykotika greifen auf unterschiedliche Arten in den fungalen Biosyntheseweg ein. Die Hemmung der Synthese von Zellwandbestandteilen, wie Ergosterol und Chitin, kann durch die Gruppe der Azole oder Griseofulvin erreicht werden. Porenbildner, die sogenannten Polyenantimykotika, wie z.B. Amphotericin, durchlöchern die Zellwand und leiten so eine Zerstörung des Mikroorganismus ein. Eine weitere Möglichkeit ergibt sich durch die Hemmung der DNA-Synthese durch Flucytosin (Hof und Dörries 2014) (Tab. 2).

Hinsichtlich der Therapie wird, neben der Lokalisation der Pilzinfektion, noch zwischen neutropenischen und nicht-neutropenischen Patienten unterschieden. Die Candidämie, als gefährlichste Infektion durch *Candida*, mit einer geschätzten Mortalität von 47%, wird primär bei nicht-neutropenischen Erwachsenen mit Fluconazol therapiert. Alternativ kann auf liposomales Amphotericin zurückgegriffen werden. Bei neutropenischen Patienten wird die Primärtherapie mit Echinocandinen oder liposomalen Amphotericin empfohlen, alternativ wird hier mit Fluconazol therapiert (Pappas, Kauffman et al. 2009). Außer der Behandlung von akuten *Candida*-Infektionen dienen Azole, Polyene und Echinocandine der präventiven Therapie. Sie kommen im Fall von Organ- und Stammzelltransplantationen, neutropenischen und Intensivpatienten zum Einsatz (Pappas, Kauffman et al. 2009).

Behandlungsstrategien werden erschwert durch intrinsische, sowie klinisch erworbene Resistenzen. *C. albicans* weist wenig Resistenzen gegenüber Antimykotika auf (Kresken,

Körber-Irrgang et al. 2015), jedoch werden Resistenzbildung gegen Azole in Isolaten von HIV-Patienten beobachtet. Dies wird auf die häufige Verwendung von Fluconazol und Itraconazol zurückgeführt (Kanafani und Perfect 2008). *C. glabrata* verfügt über eine hohe intrinsische Resistenz gegenüber Triazolen, und Resistenzen gegenüber Echinocandinen nehmen zu (Tscherner, Schwarzmüller et al. 2011, Pfaller 2012). *C. krusei* ist resistent gegen Fluconazol und Itraconazol (Mylonas, Mendling et al. 2013).

Einleitung

Tab. 2 Übersicht über Antimykotika (in Anlehnung an (Karow und Lang-Roth 2010, Parrillo und Dellinger 2013).

Stoffklasse	Freiname	Wirkmechanismus	Indikation	Besonderheit
Polyene	Amphotericin B (Ampho-Moronal®) Liposomales Amphotericin (AmBisom®)	Komplexbildung am Ergosterolgerüst in Pilzmembran, führt zu Porenbildung und zu osmotischer Instabilität	Generalisierte Mykosen: Sepsis, Meningitis, Endocarditis, sonstige Organmykosen	in der nicht liposomalen Form häufig toxische NW strenge Indikation, v.a. nephrotoxisch, lokale und intravenöse Anwendung
	Nystatin (Moronal®)	s.o.	<i>Candida</i> -Mykosen Haut, Schleimhaut, Magen-Darm-Mykosen	Lokale Anwendung, nebenwirkungsarm
Flucytosin	Flucytosin (Ancotil®)	wird anstelle von Cytosin in die Pilzzelle eingeschleust, Umwandlung zu Zytostatikum 5-Fluorouracil => u.a. Hemmung der Nukleinsäuresynthese	Kombination mit Amphotericin B bei generalisierten Mykosen	Therapie nur nach Antimykogramm, rasche Resistenzbildung, i.v. Anwendung
Azole	Ketoconazol (Nizoral®) Miconazol (Daktar®) Clotrimazol (Canesten®)	blockiert die 14a-Demethylase, hemmt die Biosynthese von Ergosterol, Anhäufung toxischer methylierter Sterole => Wachstumshemmung	Infektionen der Haut oder Schleimhaut	Imidazole zur topischen Anwendung häufige Gabe führte zu einem Anstieg der Resistenzen, v.a. fungistatische Wirkung, langsamer Wirkeintritt
	Fluconazol (Diflucan®) Voriconazol (Vfend®) Itraconazol, (Sempera®) Posaconazol (Noxafil®)	s.o.	Infektionen der Schleimhaut oder bei systemischen Mykosen,	Triazole zur systemischen Anwendung
Echinocandine	Caspofungin (Cancidas®) Anidulafungin (Ecalta®)	Glucan-Synthese-Inhibitoren: Synthesehemmung von Beta-(1,3) Glucan	Invasive Candidiasis	neue Antimykotika-Klasse

2.3 Aminocellulose

Der französische Wissenschaftler Anselme Payen charakterisiert 1838 erstmals Cellulose als Bestandteil verschiedener Pflanzen. Er bestimmte die Strukturformel mit $C_6H_{10}O_5$ (Payen 1838) (Abb. 2.9).

Im Sinne des aktuellen Bewusstseins für Nachhaltigkeit, Wirtschaftlichkeit und Umweltverträglichkeit kommt der Nutzung der Cellulose als Rohstoff eine große Bedeutung zu.

Cellulose ist ein robuster, ungiftiger, biologisch abbaubarer, billiger Werkstoff, der in großer Menge vorhanden und durch gezielten Anbau nachhaltig erneuerbar ist.

Der natürliche Rohstoff Cellulose lässt sich vor allem aus hölzernen Pflanzen gewinnen. Baumwolle und Holz dienen als Rohstoffquelle in kommerzieller Nutzung, aufgrund ihrer Reinheit. Es gibt auch Bakterien, wie *Gluconacetobacter xylinum* und *Acanthamoeba castellan* (Tarchevskiĭ und Marchenko 1991), sowie die Algen, *Valonia ventricosa* und *Chaetomorpha melagonicum* (Sugiyama, Okano et al. 1990), die Cellulose produzieren können.

In unserem täglichen Leben findet der Rohstoff in Pharmazie, Kosmetik, bei der Herstellung von Textilien oder als Baustoff Anwendung.

Durch die spezifische Struktur der Cellulose und ihrer Biokompatibilität, ergibt sich eine Vielzahl von Anwendungsgebieten im biotechnologischen und medizinischen Bereich. Verwendungsmöglichkeiten, wie Immobilisierung von Antikörpern oder Heparin, die Trennung von enantiomeren Molekülen und die Verbindung aus Cellulose und synthetischen Polymeren werden u.a. ermöglicht durch die Reaktionsfähigkeit, die der Diversität der Molekülstruktur, wie Kettenlänge, Stabilität, Verteilung von funktionellen Gruppen und Cross-link-Reaktionen zugrunde liegen (Klemm, Heublein et al. 2005).

Aminocellulose stellt hierbei einen weiteren Anwendungsbereich eines synthetisch hergestellten Polymers dar. Sie leitet sich von der Cellulose ab, dessen Monomere, D-Anhydroglucopyranosen durch β -1,4-glykosidische Bindungen miteinander verknüpft sind (Abb. 2.10).

Einleitung

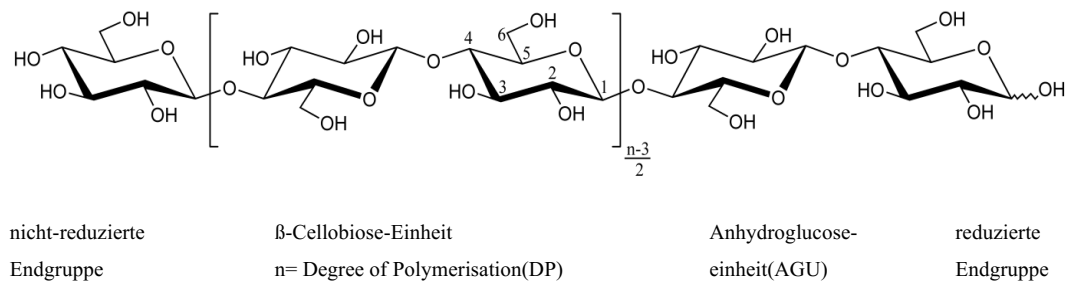


Abb. 2.9 Struktur eines Cellulosepolymers (Genco 2012).

Chemisch gesehen sind Aminocellulosen Polysaccharide mit einer Aminogruppe und/oder einer Sulfatgruppe als Rest (Genco 2012). Sie haben zudem Ähnlichkeit mit Chitosan bzw. Chitin, welches u.a. fester Bestandteil des Grundgerüsts von Krustaceen und Pilzen ist (Peter 1995, Genco 2012, Genco, Zemljič et al. 2012). Die Polymerstruktur der AC ist modifizierbar. Durch das Einbringen von geladenen Molekülen als Restgruppen, wie Sulfat- oder Aminogruppen, ergeben sich neue physikochemische Eigenschaften (Genco, Zemljič et al. 2012).

Die Herstellung von Polyampholyten, welche positiv und negativ geladene Gruppen in einem Molekül in sich tragen, wecken Hoffnungen auf neue Anwendungsbereiche in Medizin und Forschung (Genco, Zemljič et al. 2012).

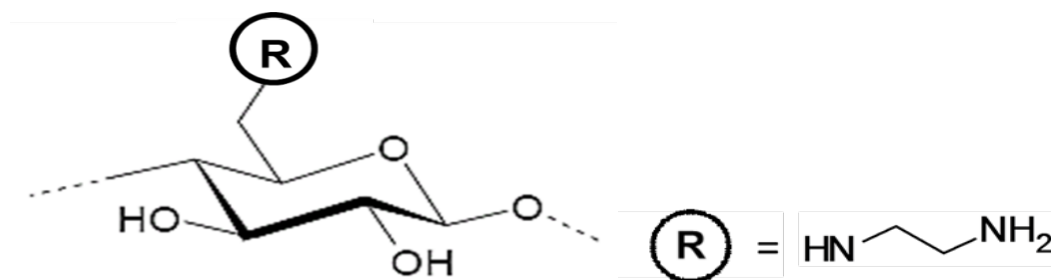


Abb. 2.10 Struktur der Grundeinheit einer Aminocellulose (links) und der funktionellen Gruppe (Ethylen-diamin; rechts).

Es wird angenommen, dass die positive Ladung der Aminogruppe mit der negativ geladenen Zelloberfläche der Pilze wechselwirkt und es dadurch zu einem Aufbrechen der Zelloberfläche bzw. zur Entstehung von Poren kommen kann (Genco, Zemljič et al. 2012). In Experimenten konnte gezeigt werden, dass in saurem Milieu die protonierten Ammonium-

gruppen der Aminocellulose eine antimikrobielle Wirkung gegen *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli* und *C. glabrata*, jedoch nicht auf *C. albicans*, hatten (Genco 2012).

Mit abnehmendem pH-Wert und ansteigender Anzahl an protonierten Ammoniumgruppen nahm die antimikrobielle Wirkung zu. Hiermit konnte die Beziehung zwischen antimikrobieller Wirkung und der Anzahl an protonierten Ammoniumgruppen belegt werden (Abb. 2.11)(Genco 2012).

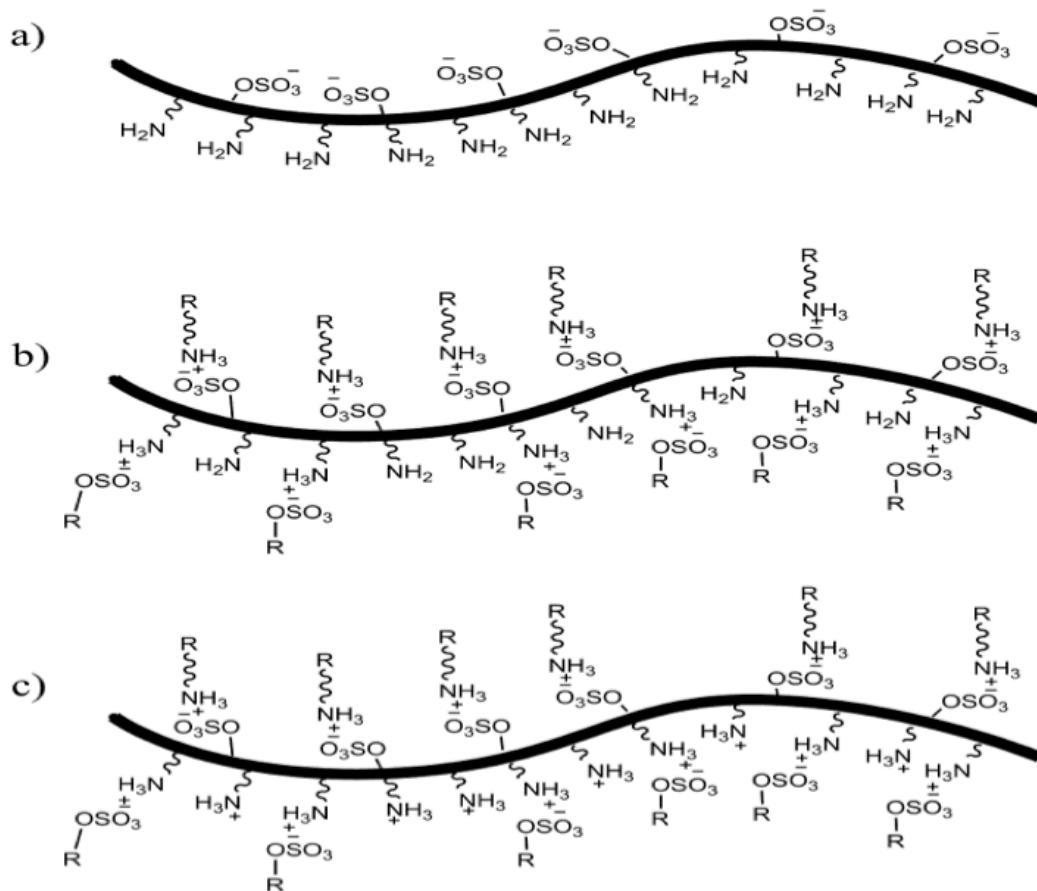


Abb. 2.11 Physikochemisches Verhalten von Aminocellulosesulfat-Derivaten, dargestellt als repräsentatives Schema. $R\text{-OSO}_3^-$ - An Cellulosepolymer gebundene Sulfatgruppe. $R \sim \text{NH}_3^+$ - An Cellulosepolymer gebundene protonierte Aminogruppe a) bei einem pH-Wert >11 sind die Aminogruppen vollständig deprotoniert und die Aminocellulosesulfat-Polymere negativ geladen. b) Das Polymer bei Isoelektrischem Punkt (pH ~9.7 BAECs und ~4.7 AECs). c) Die Aminogruppen sind vollständig protoniert bei pH <3 und das ACS Polymer ist positiv geladen (Genco 2012).

3 Ziele der Arbeit

Die physikochemischen Eigenschaften der Aminocellulosen besitzen ein vielversprechendes Potential hinsichtlich ihrer antimikrobiellen Wirkung. In der hier durchgeführten experimentellen Untersuchung soll mithilfe der Mikrotiterplattenlasernephelometrie, anhand von 24h-Wachstumskurven, die antimikrobielle Wirkung von Aminocellulosen mit unterschiedlichen DP_w (Degree of polymerisation weight) der Ausgangscellulose und unterschiedlichen DS_{EDA} (Degree of substitution of Etylendiamin) auf verschiedene, klinisch relevante *Candida* Spezies untersucht werden. Des Weiteren soll die antimikrobielle Wirkung der Aminocellulose mittels eines luminometrischen Verfahrens überprüft werden, wobei über den Adenosintriphosphat Gehalt metabolisch aktive Zellen quantifiziert werden.

Zur Unterscheidung zwischen einer fungistatischen bzw. fungiziden Wirkung werden Aminocellulose-Konzentrationen welche in der 24h Messung im Mikrotiterplattenlasernephelometer geringe oder keine Wachstumskurven aufweisen durch Ausplattieren auf Sabouraud-dextroseagar-Platten überprüft.

Anhand der Ergebnisse sollen Rückschlüsse auf den Einfluss des DP_w (Degree of polymerisation weight) bzw. des DS_{EDA} (Degree of substitution of Etylendiamin) in Bezug auf die antimikrobielle Wirkung der AC gezogen werden.

4 Methodik

4.1 Materialien

Tab. 3 Übersicht über verwendete Verbrauchsmaterialien, Geräte, Chemikalien und Software.

Materialien	
1,5 mL und 2 mL Reaktionsgefäße	Sarstedt
15 mL und 50 mL Reaktionsgefäße	GreinerBioOne
Abdeckfolie Viewseal	GreinerBioOne
aCOLyte Colony Counter	Synbiosis
Auslaufpipetten	GreinerBioOne
Autoklav	SHP Steriltechnik AG
Brutschrank	Memmert
CASY1 Model TT CellCounter	Schärfe System
Columbia-Agarplatten	BioMérieux
Combitips	Eppendorf
Drigalskyspatel	VWR International
Gasbrenner Fireboy plus	Inegtra Biosciences
Handschuhe Nitril 3000	Meditrade
Impfösen	GreinerBioOne
Kanülen Sterican Ø 1,2 mm	Braun
Kühlschrank	Liebherr
Kulturflasche mit Kapsenberg-Kappen	VWR International
Laminarbox MSC Advantage	Thermoscientific
LUMIstar Galaxy	BMG LABTECH
Mikrotiterplatten	GreinerBioOne
NEPHELOstar Galaxy	BMG LABTECH
Pipetten	Brand, Eppendorf
Schüttelwasserbad GFL 1083	Gesellschaft für Labortechnik
Vernichtungsbeutel	Nerbe Plus
Chemikalien	
BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay	Promega
Casyton	Roche
EDA-AC ₅₀ 1%ige Lösung	AG Prof. Heinze
EDA-AC ₁₁₁ 1%ige Lösung	AG Prof. Heinze
EDA-AC ₃₃₀ 1%ige Lösung	AG Prof. Heinze
EDA-AC ₄₅₄ 1%ige Lösung	AG Prof. Heinze
EDA-AC ₁₈₅₈ 1%ige Lösung	AG Prof. Heinze
NaCl 0,9 % (Physiologische Kochsalzlösung)	Fresenius Kabi

Methodik

Sabouraud-Glukose-Bouillon	Merck
Software	
Endnote 7	Thomson Reuters Version X 7.2.1
Microsoft Excel 2011	Microsoft® für Mac 2011 Version 14.4.8
Microsoft Word 2011	Microsoft® für Mac 2011 Version 14.4.8
Origin	OriginLab Version 9.1

4.2 Testsubstanzen

Es wurden fünf verschiedene AC, welche sich in dem Polymerisationsgrad der Ausgangscellulosen (DP_w) und dem Aminierungsgrad (DS_{Amin}) unterscheiden, getestet (Tab. 3). Die getesteten AC wurden von der AG Prof. Heinze, Institut für Organische und Makromolekulare Chemie, Friedrich-Schiller-Universität Jena, zur Verfügung gestellt.

Alle AC weisen Ethylendiamin (EDA) als funktionelle Gruppe auf und wurden aus verschiedenen Ausgangscellulosen synthetisiert (Tab. 4).

Die Synthese der AC erfolgte mit 3g Tosylcellulose (TC), welche in 36 mL DMSO (10g TC in 190 mL DMSO für EDA-AC₄₅₄) gelöst wurde. Die gelöste TC wurde mit EDA (25 mol pro mol AGU) versetzt und 6 h unter Argon bei 100°C gerührt. Die Aufarbeitung geschah durch Ausfällung in Aceton. EDA-AC₄₅₄ wurde zusätzlich in 720 mL Wasser gelöst und 360 mL dieser Lösung wurden nicht mit einem Ionenaustauscher behandelt.

Tab. 4 Übersicht über die getesteten Aminocellulosen.

Probenbezeichnung	Ausgangscellulose	DS_{EDA}	DS_{Tos}	Hersteller
EDA-AC ₅₀	Abgebaute Cellulose DP_w 50	0,971	1,193	R. Steinacker
EDA-AC ₁₁₁	Abgebaute Cellulose DP_w 111	0,973	1,276	R. Steinacker
EDA-AC ₃₃₀	Avicel DP_w 330	0,695	1,18	R. Steinacker
EDA-AC ₄₅₄	Cellunier F DP_w 454	0,767	0,87	R. Steinacker
EDA-AC ₁₈₅₈	FISI DP_w 1858	0,886	1,192	R. Steinacker

4.3 Kultivierung der Hefepilze

Die Hefen *Candida albicans* (DSM 1386), *Candida glabrata* (DSM 11226) und *Candida krusei* (ATCC 6258) wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) bezogen. Die Lagerung der Mikroorganismen erfolgte mittels Kryokonservierung bei -80°C in Mikrobankgefäßen. Zur Reaktivierung der Kulturen wurde aus den Mikrobankgefäßen unter sterilen Bedingungen mit einer Öse ein Bead entnommen und auf einer Sabouraud-Dextrose-Agarplatte (SDA) ausgestrichen. Die Hefen wurden anschließend für 24 h bei 37°C in einem Brutschrank bebrütet. Die weitere Lagerung der Stammkulturen erfolgte bei 4°C im Kühlschrank. Für die Versuche wurden unter sterilen Bedingungen 24 h-Arbeitskulturen angefertigt. Dazu wurden 20 mL Sabouraud-Glukose-Bouillon in 50 mL-Kulturflaschen mit Kapsenberg-Kappen gefüllt und über eine sterile Impföse die benötigten Kulturen inokuliert. Diese Arbeitskulturen wurden schließlich bei 37°C für 24 h im Schüttelwasserbad kultiviert.

4.4 Versuchsdurchführung

Für die Versuche wurden Inokula von $6 - 8 \times 10^3$ KBE/mL aus den jeweiligen *Candida* Schüttelkulturen hergestellt. Zunächst erfolgte die Bestimmung der Ausgangszellzahl der 24 h-Schüttelkulturen mittels CASY Zellzähler. Anhand der ermittelten Zellzahlen wurden die Mengen an erforderlicher Zellsuspension und SGB berechnet, welche für die Herstellung der Inokula benötigt wurden. Ausgehend von den AC-Stammlösungen (1%) wurden die Verdünnungen 1:2 bis 1:1024 in SGB hergestellt.

In die Wells D1-12, E1-12, sowie in die komplette Spalte 1 einer 96-Well-Mikrotiterplatte (MTP) wurden je 100 µL SGB vorgelegt. Je 100 µL der AC-Verdünnungen wurden in die entsprechenden Wells pipettiert (Abb. 4.1). Anschließend wurde in jedes Well, mit Ausnahme von Reihe D und E, 100 µL *Candida* Suspension hinzu pipettiert. Jeder Messung lagen, wie in Abb. 4.1 zu sehen ist, sechs identisch Hefe- Aminocellulose Suspensionen zu Grunde. Die MTP wurden mit einer durchsichtigen Folie verschlossen. Da diese nicht Gas durchlässig ist, wurde mit einer Kanüle in der Nähe jedes Wellrands ein Loch in die Folie gestochen.

Im beschriebenen Versuchsaufbau wurden die o.g. Hefen mit den fünf o.g. Testsubstanzen (AC) untersucht (n= 15). Es erfolgten zwei Messreihen zu jedem Versuch (n=2).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	SGB+ C. alb.	AC 1:1024 + C.alb.	AC 1:512 + C.alb.	AC 1:256 + C.alb.	AC 1:128 + C.alb.	AC 1:64 + C.alb.	AC 1:32 + C.alb.	AC 1:16 + C.alb.	AC 1:8 + C.alb.	AC 1:4 + C.alb.	AC 1:2 + C.alb.	AC 1:1 + C.alb.
B	SGB+ C. alb.	AC 1:1024 + C.alb.	AC 1:512 + C.alb.	AC 1:256 + C.alb.	AC 1:128 + C.alb.	AC 1:64 + C.alb.	AC 1:32 + C.alb.	AC 1:16 + C.alb.	AC 1:8 + C.alb.	AC 1:4 + C.alb.	AC 1:2 + C.alb.	AC 1:1 + C.alb.
C	SGB+ C. alb.	AC 1:1024 + C.alb.	AC 1:512 + C.alb.	AC 1:256 + C.alb.	AC 1:128 + C.alb.	AC 1:64 + C.alb.	AC 1:32 + C.alb.	AC 1:16 + C.alb.	AC 1:8 + C.alb.	AC 1:4 + C.alb.	AC 1:2 + C.alb.	AC 1:1 + C.alb.
D	SGB	SGB + AC 1:1024	SGB + AC 1:512	SGB + AC 1:256	SGB + AC 1:128	SGB + AC 1:64	SGB + AC 1:32	SGB + AC 1:16	SGB + AC 1:8	SGB + AC 1:4	SGB + AC 1:2	SGB + AC 1:1
E	SGB	SGB + AC 1:1024	SGB + AC 1:512	SGB + AC 1:256	SGB + AC 1:128	SGB + AC 1:64	SGB + AC 1:32	SGB + AC 1:16	SGB + AC 1:8	SGB + AC 1:4	SGB + AC 1:2	SGB + AC 1:1
F	SGB+ C. alb.	AC 1:1024 + C.alb.	AC 1:512 + C.alb.	AC 1:256 + C.alb.	AC 1:128 + C.alb.	AC 1:64 + C.alb.	AC 1:32 + C.alb.	AC 1:16 + C.alb.	AC 1:8 + C.alb.	AC 1:4 + C.alb.	AC 1:2 + C.alb.	AC 1:1 + C.alb.
G	SGB+ C. alb.	AC 1:1024 + C.alb.	AC 1:512 + C.alb.	AC 1:256 + C.alb.	AC 1:128 + C.alb.	AC 1:64 + C.alb.	AC 1:32 + C.alb.	AC 1:16 + C.alb.	AC 1:8 + C.alb.	AC 1:4 + C.alb.	AC 1:2 + C.alb.	AC 1:1 + C.alb.
H	SGB+ C. alb.	AC 1:1024 + C.alb.	AC 1:512 + C.alb.	AC 1:256 + C.alb.	AC 1:128 + C.alb.	AC 1:64 + C.alb.	AC 1:32 + C.alb.	AC 1:16 + C.alb.	AC 1:8 + C.alb.	AC 1:4 + C.alb.	AC 1:2 + C.alb.	AC 1:1 + C.alb.

Abb. 4.1 Schema der Beschickung einer Mikrotiterplatte am Beispiel von *C. albicans*.

4.5 Nephelometrie

Passiert ein Lichtstrahl eine Suspension, so wird ein Teil des Lichtes absorbiert und ein Teil wird reflektiert. Das seitlich und nach vorn gestreute Licht ist für die Detektion in der Nephelometrie von Bedeutung. Diese Streuung des Lichts kommt aufgrund der Trübung von Flüssigkeiten zustande, hervorgerufen durch die in der Suspension enthalten Partikel. Der Laserstrahl des Nephelometers trifft auf die Partikel, wird nach vorn abgelenkt und über Linsen auf einer Photodiode oder einem Photomultiplier gemessen (Abb. 4.2; Abb. 4.3). Charakteristische Werte sind die Streuungsintensität und der Streuungskoeffizient. Erster gibt an, wie viel Licht in einem bestimmten Winkel gestreut wird, zweiter gibt die Gesamtmenge des Streulichtes an, welche dem einfallenden Licht entzogen wurde. Je größer die Streuung des Lichts, desto größer die Konzentration der Partikel in der Lösung (Hipler et al. 2003) (Abb. 4.4).

Methodik

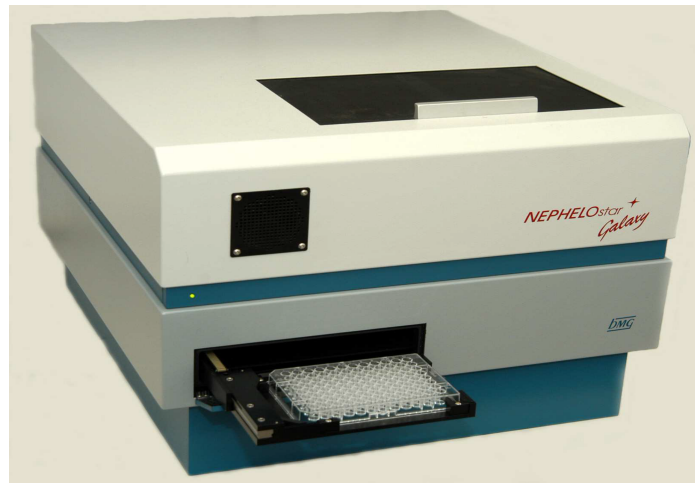


Abb. 4.2 Mikrotiterplatten-Lasernephelometer „NEPHELOstar Galaxy“ (BMG LABTECH).



Abb. 4.3 Laser des Nephelometers.

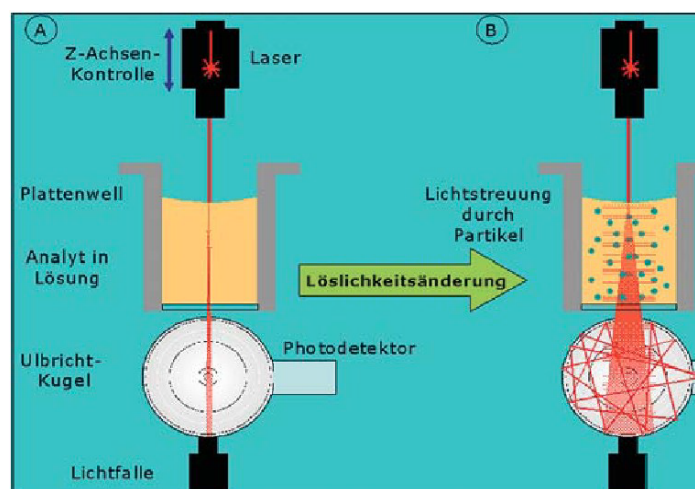


Abb. 4.4 Funktionsprinzip eines Nephelometers (Hipler et al. 2003).

Ein ähnliches lichtabhängiges Verfahren ist die Turbidimetrie oder auch Photometrie; hier wird ebenfalls ein Lichtstrahl durch eine Suspension transmittiert. Die Teilchen in der Suspension absorbieren ein Teil des Lichtes, gemessen wird die Differenz des einfallenden und des austretenden Lichtes als Extinktion.

Die hohe Sensitivität der Nephelometrie, der Turbidimetrie deutlich überlegen, eignet sich zur Detektion von geringen Konzentrationen von Mikroorganismen im Rahmen eines Wachstumsmonitoring (Fouda, Knittel et al. 2006) und wurde in der vorliegenden Arbeit zum Nachweis der antimykotischen Wirkung von AC auf *Candida spp.* verwendet.

Hierfür wurden die vorbereiteten MTP, wie bereits beschrieben, über einen Zeitraum von 24 h bei 37°C im Nephelometer unter Schütteln inkubiert. Stündlich erfolgte die Messung der Trübung in den einzelnen Wells. Die Werte werden von dem Gerät als Relative Nephelometer Einheiten (RNU) ausgegeben. Anhand der gemessenen RNU werden über den Zeitraum von 24h Wachstumskurven erstellt.

4.6 Luminometrie

Bei der Lumineszenzmessung wird emittiertes Licht in Form von Lichtblitzen oder einem Leuchten von einem Luminometer gemessen (Abb. 4.5). Bei diesem sensitiven Verfahren handelt es sich um eine kinetische Endzeitpunktmessung (Finger, Wiegand et al. 2012).

In dieser Arbeit wurde der BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay verwendet. Hierbei handelt es sich um einen Test, mit welchem quantitative Aussagen über metabolisch aktive Zellen getroffen werden können (Chen und Cushion 1994, Mempin, Tran et al. 2013). Nur in Anwesenheit von ATP wird Luciferin über das Enzym Luciferase in Oxyluciferin umgesetzt, dabei wird ATP zu AMP und Phosphat hydrolysiert (Abb. 4.6). Das Charakteristische dieser enzymatischen Umsetzung besteht in der Emittierung von Licht durch die Aktivität der Luziferase, was mithilfe eines Luminometers gemessen werden kann (Marques und Esteves da Silva 2009). Die Stärke des Signals ist dabei proportional zur Menge des vorhandenen ATP, welche wiederum direkt proportional zur Anzahl der lebenden Zellen ist (Promega 2012).

Dieser Nachweis wurde direkt im Anschluss an die nephelometrischen Untersuchungen angeschlossen. Hierzu wurden die MTP aus dem Nephelometer entnommen und für 10 min bei Raumtemperatur unter Schütteln equilibriert. In der Zwischenzeit wurden in die

Methodik

Wells einer weißen 96-Well-MTP pro Well 90 μL SGB vorgelegt. Je 10 μL der *Candida*-AC-Suspensionen aus der Nephelometrie-MTP wurde in die vorbereitete weiße MTP überführt. Zu jedem Well wurden 100 μL BacTiter Glo-Reagenz hinzu pipettiert. Dieser Ansatz wurde für 15 min unter Schütteln im Dunklen bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend im Luminometer gemessen. Bei jedem Test wurde eine ATP-Standardkurve mitgeführt, sodass der jeweilige ATP-Gehalt pro Well berechnet werden konnte.



Abb. 4.5 Luminometer „LUMIstar Omega“ (BMG LABTECH).

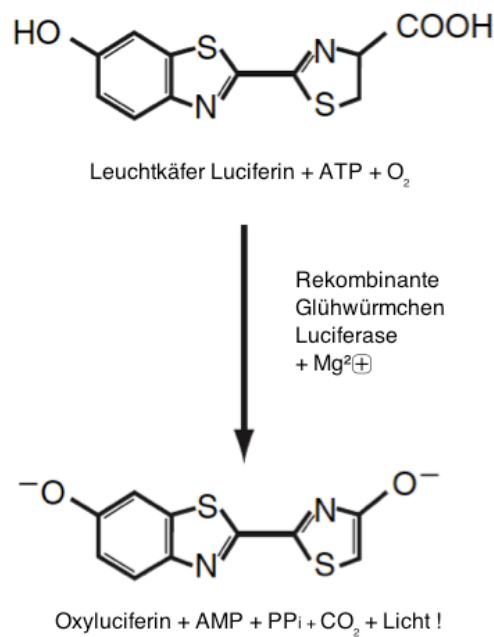


Abb. 4.6 Reaktionsgleichung des ATP-Biolumineszenz-Assay (Promega).

4.7 Überprüfung der antimykotischen Wirkung

Konnte bei den 24 stündigen nephelometrischen Messungen eine Hemmung des Hefewachstums festgestellt werden, so wurden am Ende der Messung je 100 µL aus den entsprechenden Wells, aus einer horizontalen Reihe der Mikrotiterplatte, auf SDA-Platten ausplattiert und für weitere 24h im Brutschrank inkubiert (Abb. 4.7). Danach wurden die SDA-Platten auf mikrobielles Wachstum überprüft. In dem Fall, dass keine Kolonien gebildet wurden, war von einer fungiziden Wirkung auszugehen. Sind jedoch Kolonien auf den Platten gewachsen, so lag eine fungistatische Wirkung vor. Die Methodik wurde im Folgenden als Überprüfung auf SDA-Platten bezeichnet.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	SGB+ C. alb.	AC 1:1024 + C.alb.	AC 1:512 + C.alb.	AC 1:256 + C.alb.	AC 1:128 + C.alb.	AC 1:64 + C.alb.	AC 1:32 + C.alb.	AC 1:16 + C.alb.	AC 1:8 + C.alb.	AC 1:4 + C.alb.	AC 1:2 + C.alb.	AC 1:1 + C.alb.
B	SGB+ C. alb.	AC 1:1024 + C.alb.	AC 1:512 + C.alb.	AC 1:256 + C.alb.	AC 1:128 + C.alb.	AC 1:64 + C.alb.	AC 1:32 + C.alb.	AC 1:16 + C.alb.	AC 1:8 + C.alb.	AC 1:4 + C.alb.	AC 1:2 + C.alb.	AC 1:1 + C.alb.
C	SGB+ C. alb.	AC 1:1024 + C.alb.	AC 1:512 + C.alb.	AC 1:256 + C.alb.	AC 1:128 + C.alb.	AC 1:64 + C.alb.	AC 1:32 + C.alb.	AC 1:16 + C.alb.	AC 1:8 + C.alb.	AC 1:4 + C.alb.	AC 1:2 + C.alb.	AC 1:1 + C.alb.
D	SGB	SGB + AC 1:1024	SGB + AC 1:512	SGB + AC 1:256	SGB + AC 1:128	SGB + AC 1:64	SGB + AC 1:32	SGB + AC 1:16	SGB + AC 1:8	SGB + AC 1:4	SGB + AC 1:2	SGB + AC 1:1
E	SGB	SGB + AC 1:1024	SGB + AC 1:512	SGB + AC 1:256	SGB + AC 1:128	SGB + AC 1:64	SGB + AC 1:32	SGB + AC 1:16	SGB + AC 1:8	SGB + AC 1:4	SGB + AC 1:2	SGB + AC 1:1
F	SGB+ C. alb.	AC 1:1024 + C.alb.	AC 1:512 + C.alb.	AC 1:256 + C.alb.	AC 1:128 + C.alb.	AC 1:64 + C.alb.	AC 1:32 + C.alb.	AC 1:16 + C.alb.	AC 1:8 + C.alb.	AC 1:4 + C.alb.	AC 1:2 + C.alb.	AC 1:1 + C.alb.
G	SGB+ C. alb.	AC 1:1024 + C.alb.	AC 1:512 + C.alb.	AC 1:256 + C.alb.	AC 1:128 + C.alb.	AC 1:64 + C.alb.	AC 1:32 + C.alb.	AC 1:16 + C.alb.	AC 1:8 + C.alb.	AC 1:4 + C.alb.	AC 1:2 + C.alb.	AC 1:1 + C.alb.
H	SGB+ C. alb.	AC 1:1024 + C.alb.	AC 1:512 + C.alb.	AC 1:256 + C.alb.	AC 1:128 + C.alb.	AC 1:64 + C.alb.	AC 1:32 + C.alb.	AC 1:16 + C.alb.	AC 1:8 + C.alb.	AC 1:4 + C.alb.	AC 1:2 + C.alb.	AC 1:1 + C.alb.

Abb. 4.7 Schema der Beschickung einer Mikrotiterplatte. Rot markiert die Probenentnahme zur Überimpfung und Anzucht auf SDA-Agarplatten nach 24 h nephelometrischer Messung.

5 Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse der nephelometrischen und luminometrischen Messungen dargestellt und anhand der ermittelten IC_{50} mit einander verglichen. Aufgrund der vereinheitlichten Skalierung, werden bei einigen nephelometrischen Untersuchungen im Bereich von 0-1000 RNU die niedrigsten Messwerte nicht in der Grafik dargestellt. Im Hinblick auf die Ergebnisse gilt für diese Messwerte eine vollständige Wachstumshemmung. Ergänzend wird darauf hingewiesen, dass die Fehlerbalken in der Luminometrie der Standardabweichung des Mittelwerts entsprechen.

5.1 Wachstum von *C. albicans* unter dem Einfluss von EDA-AC₅₀

Die Aminocellulose EDA-AC₅₀ besitzt von allen fünf getesteten AC den niedrigsten Polymerisationsgrad in der Ausgangscellulose und mit $DS_{Amin} = 0,971$ einen der höchsten Aminierungsgrade. Die Ergebnisse die mithilfe der Mikrotiterplattenlasernephelometrie erhalten wurden zeigen ab einer Konzentration von 20 µg/mL ein verzögertes Wachstum von *C. albicans*. Eine komplette Hemmung des Wachstums konnte mit Konzentrationen größer als 78 µg/mL erreicht werden (Abb. 5.1). Ähnliche Ergebnisse konnten auch anhand der luminometrischen Untersuchung gezeigt werden. Ab einer AC-Konzentration von 156 µg/mL war eine deutliche Abnahme an metabolisch aktiven Hefezellen nachweisbar. Bei höheren Konzentrationen konnte nur noch eine geringe Menge an ATP bzw. kein ATP mehr nachgewiesen werden (Abb. 5.2). Der IC_{50} -Wert anhand der luminometrischen Untersuchung war mit $187,15 \mu\text{g/mL} \pm 28,35 \mu\text{g/mL}$ nahezu zehnfach höher, als der mittels Nephelometrie ermittelte Wert ($21 \mu\text{g/mL} \pm 2 \mu\text{g/mL}$) (Tab. 6). Nach dem Ausplattieren der Proben mit beobachteter Wachstumshemmung konnte im Mittel ab 938 µg/mL eine fungizide Wirkung von EDA-AC₅₀ gegenüber *C. albicans* festgestellt werden (Tab. 7).

Ergebnisse

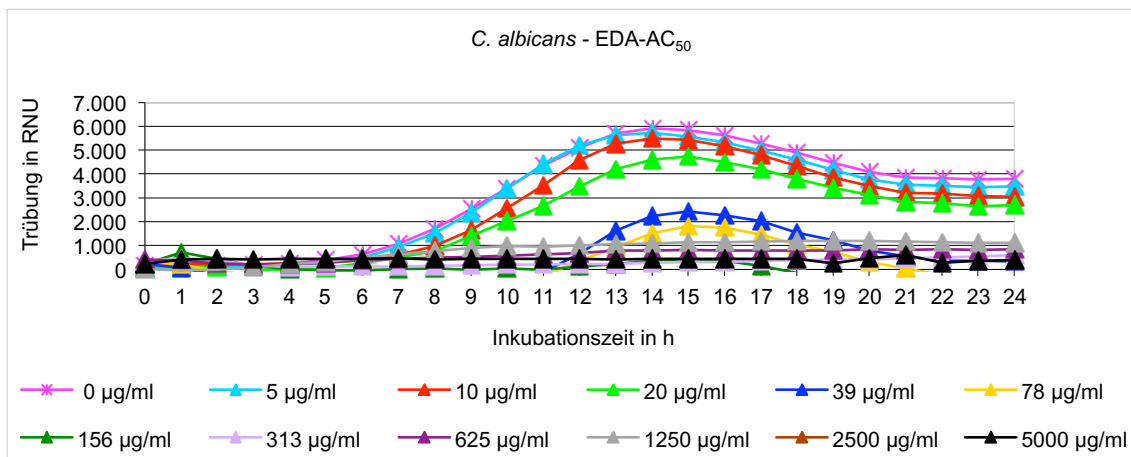


Abb. 5.1 Nephelometrische Untersuchung von *C. albicans* unter dem Einfluss der EDA-AC₅₀.

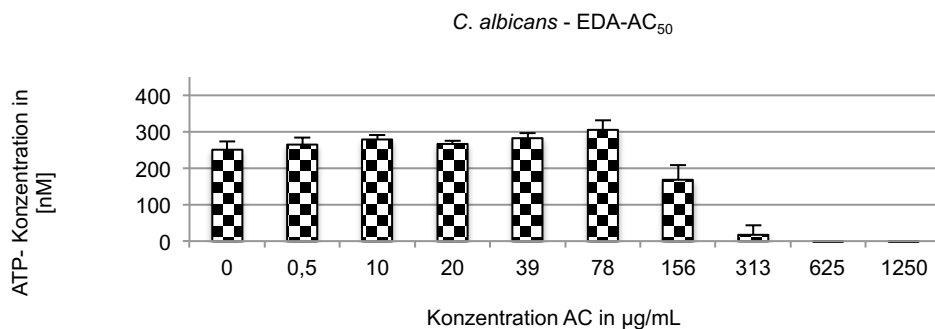


Abb. 5.2 Luminometrische Untersuchung von *C. albicans* unter dem Einfluss der EDA-AC₅₀.

5.2 Wachstum von *C. albicans* unter dem Einfluss von EDA-AC₁₁₁

Die AC mit der abgebauten Cellulose ($DP_w = 111$) als Ausgangsmaterial und dem höchsten $DS_{Amin} = 0,973$ besitzt ebenfalls eine hemmende Wirkung auf das Wachstum von *C. albicans*. Eine vollständige Hemmung des Wachstums konnte ab einer Konzentration von 313 µg/mL anhand der Wachstumsuntersuchung im Nephelometer beobachtet werden (Abb. 5.3). Auch bei der luminometrischen Untersuchungsmethode konnten ab 313 µg/mL nur noch geringe ATP-Mengen bzw. ab 625 µg/mL kein ATP mehr nachgewiesen werden (Abb. 5.4). Die AC-Konzentrationen, bei denen 50% der Hefen abgetötet wurden, betrugen $215,35 \mu\text{g/mL} \pm 3,05 \mu\text{g/mL}$ (luminometrisch) und $16,5 \mu\text{g/mL} \pm 2,5 \mu\text{g/mL}$ (nephelometrisch) (Tab. 6). Eine fungizide Wirkung konnte mit 625 µg/mL EDA-AC₁₁₁ erzielt werden (Tab. 7).

Ergebnisse

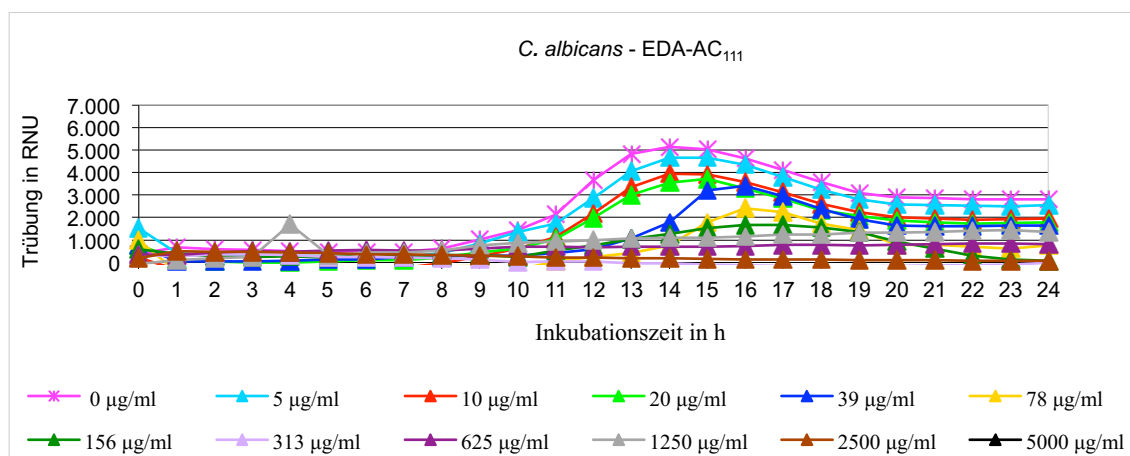


Abb. 5.3 Nephelometrische Untersuchung von *C. albicans* unter dem Einfluss der EDA-AC₁₁₁.

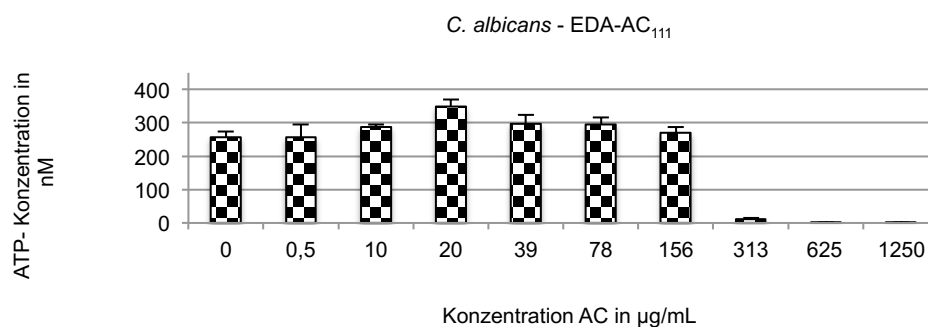


Abb. 5.4 Luminometrische Untersuchung von *C. albicans* unter dem Einfluss der EDA-AC₁₁₁.

5.3 Wachstum von *C. albicans* unter dem Einfluss von EDA-AC₃₃₀

Bei der Aminocellulose EDA-AC₃₃₀, hergestellt aus der Ausgangszellulose Avicel, mit einem mittleren Polymerisierungsgrad und der geringsten Funktionalisierung ($DS_{\text{Amin}} = 0,695$) konnte nephelometrisch für *C. albicans* eine komplette Wachstumshemmung ab einer Konzentration von 156 µg/mL nachgewiesen werden. Bereits bei der niedrigsten AC-Konzentration von 5 µg/mL, war das Wachstum verringert. Mit zunehmender AC-Konzentration nimmt das Wachstum von *C. albicans* weiter kontinuierlich ab. Die Wachstumskurve der Kontrolle erreicht ihr Maximum nach etwa 15 h. Die Wachstumskurven von *C. albicans* unter Einfluss der AC erreichen bis zu einer Konzentration von 39 µg/mL ihr Kurvenmaximum, im Vergleich zur Kontrolle etwa eine Stunde früher (Abb. 5.5). Bei der

Ergebnisse

Überimpfung der *Candida spp.* auf Agarplatten, konnte eine fungizide Wirkung ab einer durchschnittlichen Konzentration von 1250 µg/mL bestimmt werden (Tab. 7).

Das Diagramm der luminometrischen Untersuchung zeigt ab einer Konzentration von 625 µg/mL eine fungizide Wirkung. Ab einer Konzentration von 313 µg/mL ist eine deutliche Abnahme der Vitalität von *C. albicans* erkennbar (Abb. 5.6). Die ermittelten IC₅₀ betragen luminometrisch 290,45 µg/mL ± 23,55 µg/mL bzw. 21 µg/mL ± 2 µg/mL anhand der nephelometrischen Untersuchung (Tab. 6).

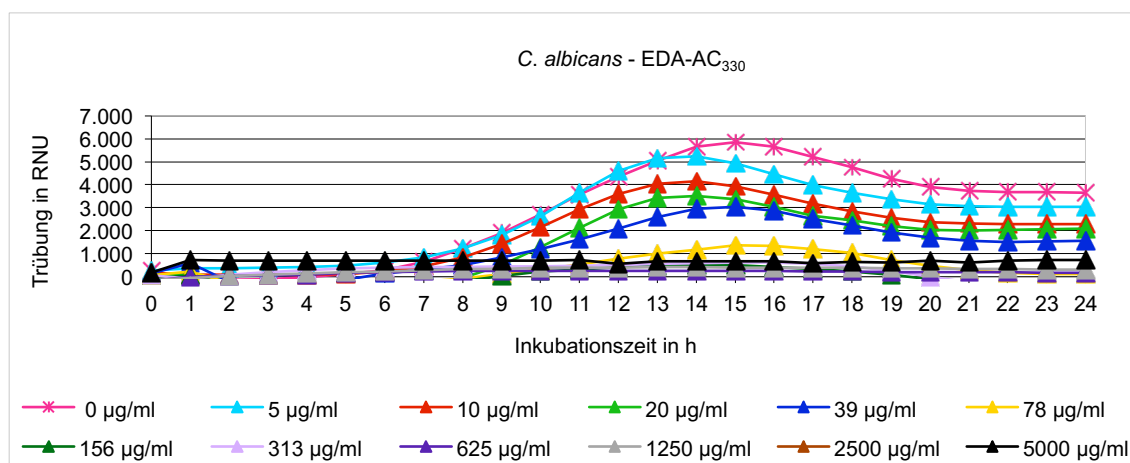


Abb. 5.5 Nephelometrische Untersuchung von *C. albicans* unter dem Einfluss der EDA-AC₃₃₀.

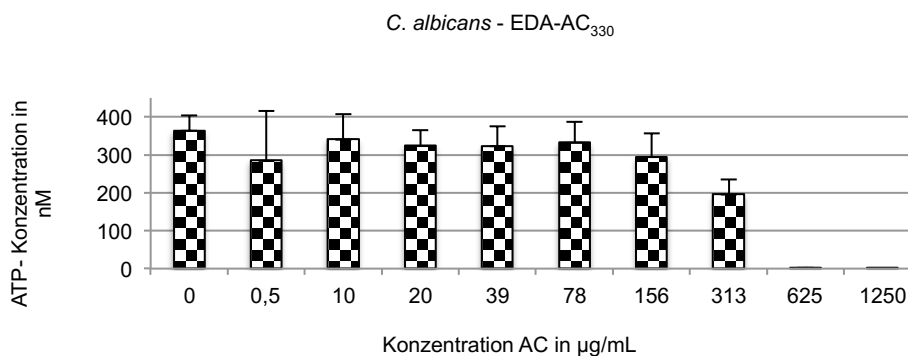


Abb. 5.6 Luminometrische Untersuchung von *C. albicans* unter dem Einfluss der EDA-AC₃₃₀.

5.4 Wachstum von *C. albicans* unter dem Einfluss von EDA-AC₄₅₄

EDA-AC₄₅₄, mit einem mittleren Polymerisierungs- sowie Substituierungsgrad ($DP_w = 454$ und $DS_{Amin} = 0,767$), konnte bei der nephelometrischen Wachstumsuntersuchung von *C. albicans* mit zunehmender Konzentration eine stetige Abnahme des mikrobiellen Wachstums bewirken. Bei einer Konzentration von 625 $\mu\text{g/mL}$ war kein sichtbares Hefewachstum zu erkennen (Abb. 5.7).

Bei der sensitiveren luminometrischen Messung zeigte sich bei dieser AC-Konzentration eine deutliche Abnahme der Viabilität von *C. albicans*. Ab einer AC-Konzentration von 1250 $\mu\text{g/mL}$ konnte kein ATP und somit auch keine viablen Hefezellen nachgewiesen werden (Abb. 5.8). Für EDA-AC₄₅₄ wurden IC_{50} -Werte von $592,1 \mu\text{g/mL} \pm 31,2 \mu\text{g/mL}$ (luminometrisch) und $65 \mu\text{g/mL} \pm 1 \mu\text{g/mL}$ (nephelometrisch) ermittelt (Tab. 6). Für die AC-Konzentrationen, für welche bei der Nephelometrie eine Hemmung von *C. albicans* beobachtet werden konnte, zeigte die Überprüfung auf mikrobielles Wachstum, durch die Anzucht auf Agarplatten, dass im Mittel eine Konzentration von 1250 $\mu\text{g/mL}$ nur eine fungistate Wirkung aufwies, wobei mit höheren Konzentrationen eine vollständige Hemmung erzielt werden konnte (Tab. 7).

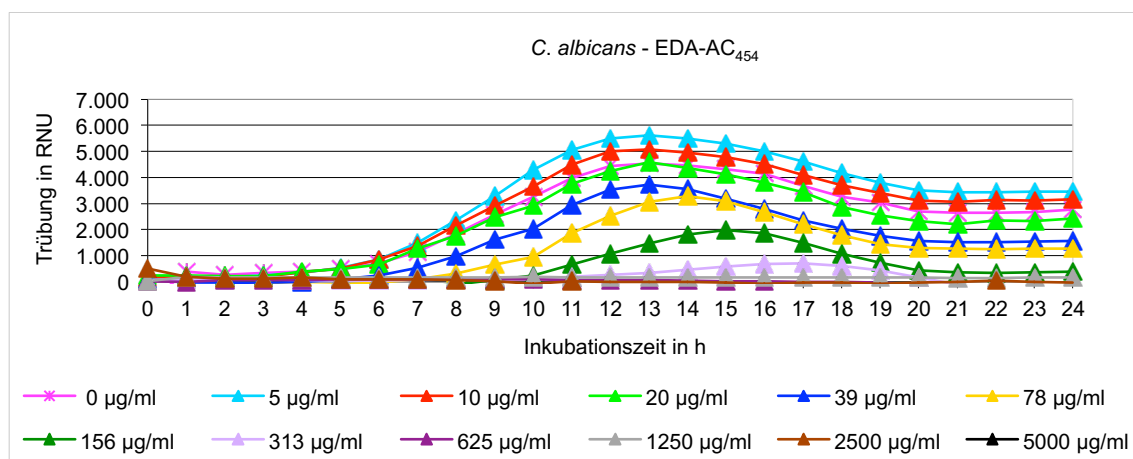


Abb. 5.7 Untersuchung von *C. albicans* unter dem Einfluss der EDA-AC₄₅₄.

Ergebnisse

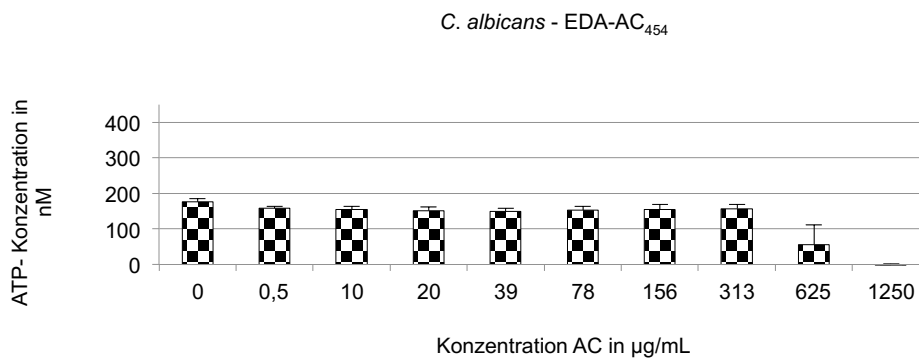


Abb. 5.8 Luminometrische Untersuchung von *C. albicans* unter dem Einfluss der EDA-AC₄₅₄.

5.5 Wachstum von *C. albicans* unter dem Einfluss von EDA-AC₁₈₅₈

Die Aminocellulose mit dem höchsten Polymerisationsgrad der Ausgangscellulose, EDA-AC₁₈₅₈, zeigt ebenfalls eine antimykotische Wirkung gegenüber *C. albicans*. Ein verzögertes Wachstum von *C. albicans* war bereits ab einer AC-Konzentration von 5 µg/mL zu beobachten. Ab einer Konzentration von 625 µg/mL konnte nephelometrisch kein Wachstum der Hefe verzeichnet werden (Abb. 5.9).

Anhand der luminometrischen Untersuchung konnte erst ab einer AC-Konzentration von 1250 µg/mL eine Hemmung von *C. albicans* erzielt werden. Bei einer AC-Konzentration von 625 µg/mL konnte im Vergleich zur Kontrolle eine Abnahme der Viabilität von *C. albicans* gezeigt werden (Abb. 5.10). Diese Beobachtung spiegelt auch der berechnete IC₅₀-Wert für diese Messung wider. Der IC₅₀-Wert betrug in diesem Fall 625,55 µg/mL ± 42,85 µg/mL. Der IC₅₀-Wert, welcher anhand der Nephelometrie-Ergebnisse ermittelt werden konnte, betrug 22 µg/mL ± 5 µg/mL (Tab. 6). Die EDA-AC₁₈₅₈ besitzt ab einer Konzentration von 1875 µg/mL eine fungizide Wirkung gegenüber *C. albicans* (Tab. 7).

Ergebnisse

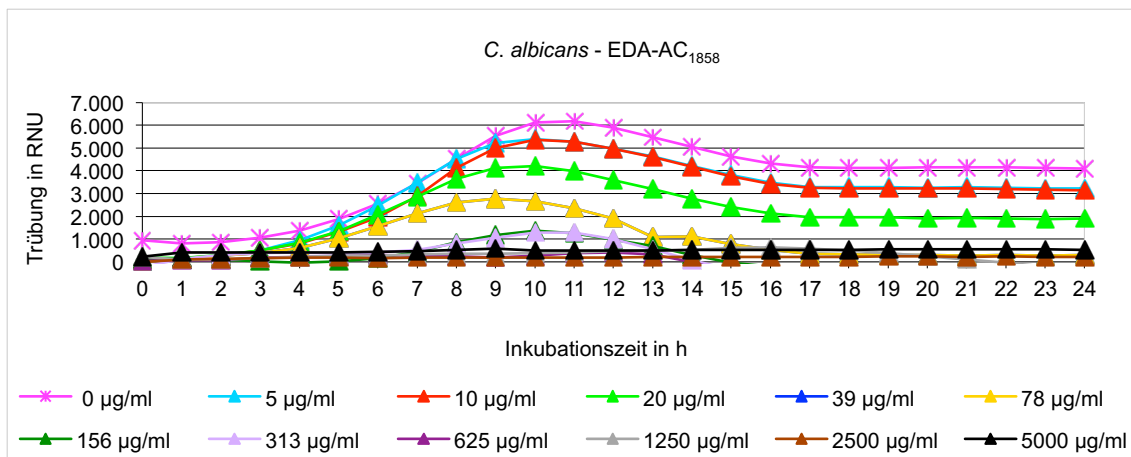


Abb. 5.9 Nephelometrische Untersuchung von *C. albicans* unter dem Einfluss der EDA-AC₁₈₅₈.

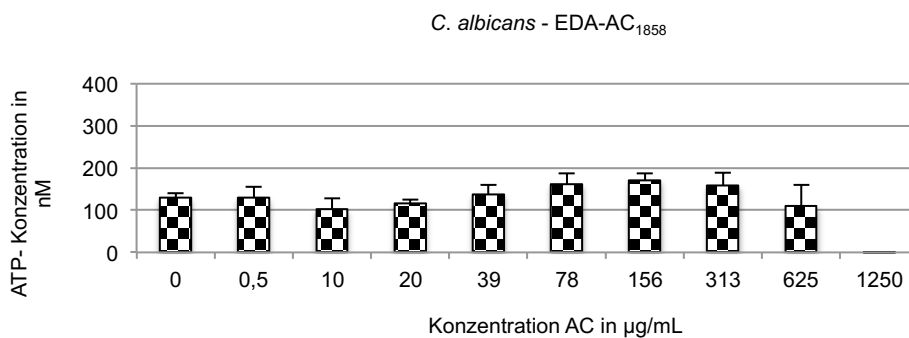


Abb. 5.10 Luminometrische Untersuchung von *C. albicans* unter dem Einfluss der EDA-AC₁₈₅₈.

5.6 Wachstum von *C. glabrata* unter dem Einfluss von EDA-AC₅₀

Der Wachstumsverlauf der *C. glabrata*-Kontrolle, in der nephelometrischen Untersuchung, zeigt eine lange Latenzzeit von 8h. Nach Erreichen des Wachstumsmaximums folgt der zügige Übergang in eine Plateauphase. Der Einfluss der Aminocellulose EDA-AC₅₀ bewirkt eine Wachstumshemmung mit steigender AC-Konzentration. Eine leichte Wachstumsverzögerung zur Kontrolle zeichnet sich ab. Eine vollständige Wachstumshemmung ist bei 78 µg/mL erreicht (Abb. 5.11). Die Auszählung der Agarplatten ergab eine durchschnittliche fungizide Konzentration ab 938 µg/mL (Tab. 7).

Im Vergleich hierzu zeigte sich bei der luminometrischen Messung eine Abwesenheit von metabolisch aktiven Hefezellen ab einer Konzentration von 313 µg/mL (5.12). Der IC₅₀-

Ergebnisse

Wert der Luminometrie beträgt $203,45 \mu\text{g/mL} \pm 7,25 \mu\text{g/mL}$ und der, der Nephelometrie $21,5 \mu\text{g/mL} \pm 0,5 \mu\text{g/mL}$ (Tab.6).

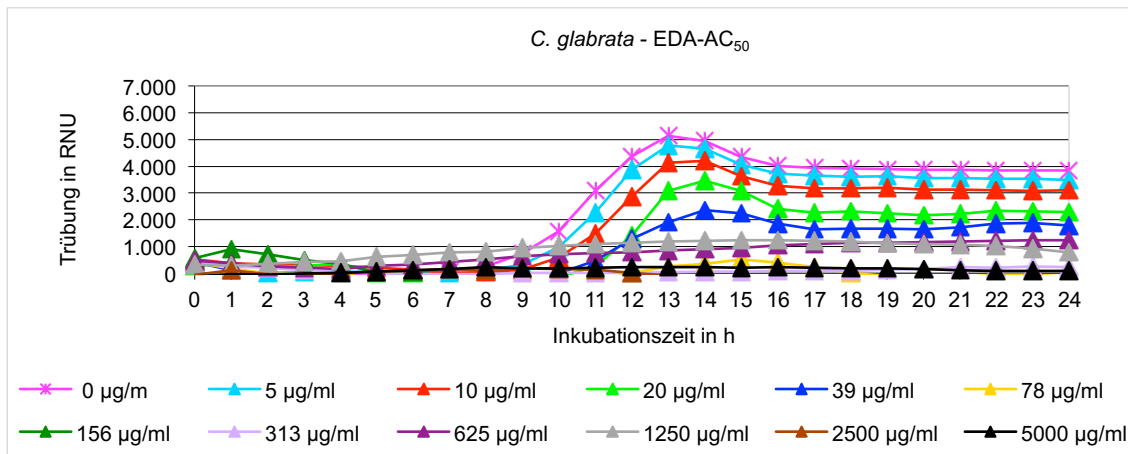


Abb. 5.11 Nephelometrische Untersuchung von *C. glabrata* unter dem Einfluss der EDA-AC₅₀.

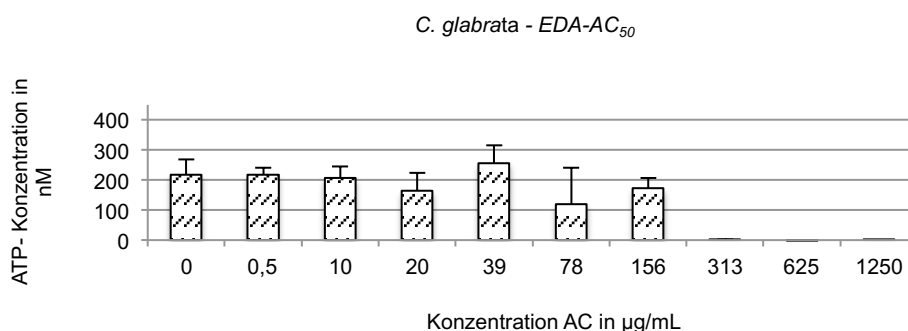


Abb. 5.12 Luminometrische Untersuchung von *C. glabrata* unter dem Einfluss der EDA-AC₅₀.

5.7 Wachstum von *C. glabrata* unter dem Einfluss von EDA-AC₁₁₁

Das Wachstum von *C. glabrata* unter dem Einfluss von EDA-AC₁₁₁ ist bis zu einer Konzentration von $20 \mu\text{g/mL}$ in der nephelometrischen Untersuchung deutlich nachweisbar. Oberhalb von $78 \mu\text{g/mL}$ kommt das Wachstum komplett zum Erliegen (Abb. 5.13). Bei der Überprüfung der AC-Konzentrationen zeigte sich gemittelt erst bei $3125 \mu\text{g/mL}$ kein Hefewachstum auf den Agarplatten (Tab. 7).

Luminometrisch kann ab $313 \mu\text{g/mL}$ keine Viabilität mehr festgestellt werden. (Abb. 5.14). Die IC₅₀-Werte liegen bei $172,4 \mu\text{g/mL} \pm 17,4 \mu\text{g/mL}$ (luminometrisch) bzw. bei $13,5 \mu\text{g/mL} \pm 1,5 \mu\text{g/mL}$ (nephelometrisch) (Tab. 6).

Ergebnisse

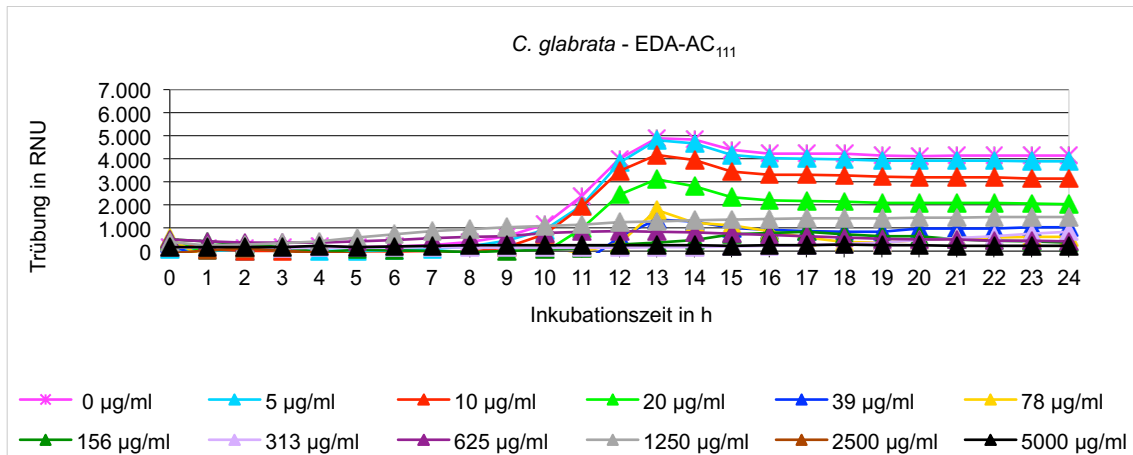


Abb. 5.13 Nephelometrische Untersuchung von *C. glabrata* unter dem Einfluss der EDA-AC₁₁₁.

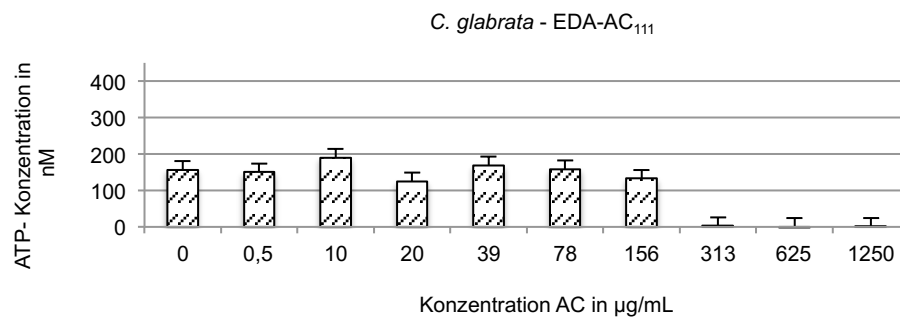


Abb. 5.14 Luminometrische Untersuchung von *C. glabrata* unter dem Einfluss der EDA-AC₁₁₁.

5.8 Wachstum von *C. glabrata* unter dem Einfluss von EDA-AC₃₃₀

Bei der Inkubation von *C. glabrata* mit EDA-AC₃₃₀, ist ab einer Konzentration von 156 µg/mL, eine vollständige Wachstumshemmung zu beobachten (Abb. 5.15). Ab einer Konzentration von 2500 µg/mL waren bei der Überimpfung auf SDA-Platten keine Kolonien erkennbar (Tab. 7). Luminometrisch ist ab 625 µg/mL kein ATP nachweisbar (Abb. 5.16). Anhand der lumino- und nephelometrischen Daten wurden IC₅₀-Werte von 321,1 µg/mL ± 12,1 µg/mL bzw. 19 µg/mL ± 11 µg/mL berechnet (Tab. 6).

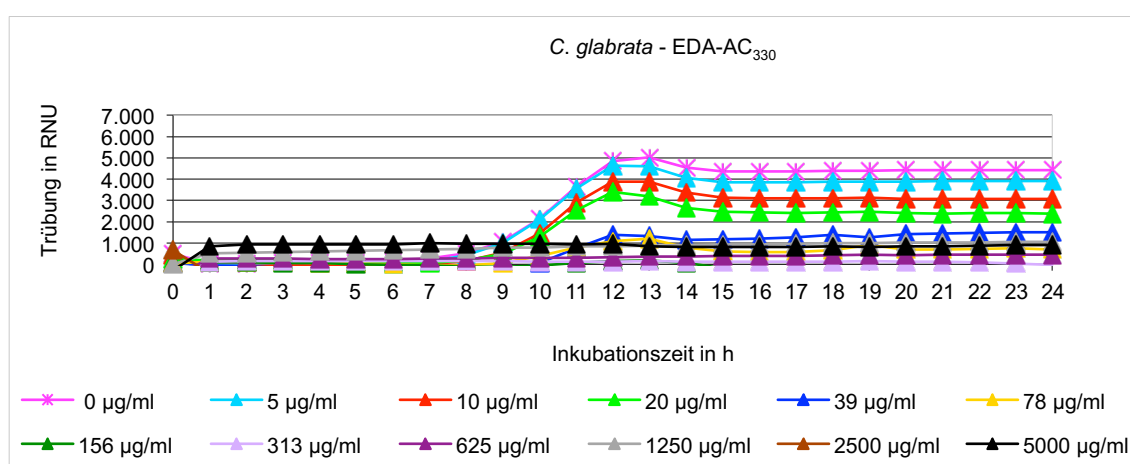


Abb. 5.15 Nephelometrische Untersuchung von *C. glabrata* unter dem Einfluss der EDA-AC₃₃₀.

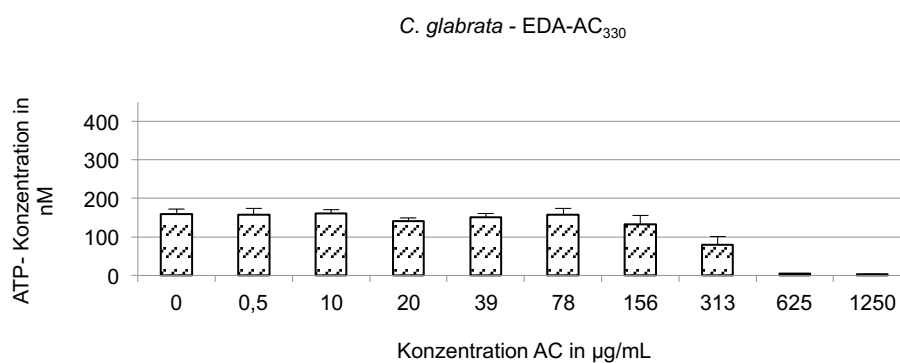


Abb. 5.16 Luminometrische Untersuchung von *C. glabrata* unter dem Einfluss der EDA-AC₃₃₀.

5.9 Wachstum von *C. glabrata* unter dem Einfluss von EDA-AC₄₅₄

EDA-AC₄₅₄ führte ab einer Konzentration von 313 µg/mL bei *C. glabrata* zu einer vollständigen Wachstumshemmung (Abb. 5.17). Die Überprüfung auf SDA-Platten ergab eine komplette Wachstumshemmung ab einer Konzentration von 2500 µg/mL (Tab. 7).

Bei der Lumineszenzmessung war ab 313 µg/mL keine metabolisch aktive Hefezelle mehr nachweisbar (Abb. 5.18). Die gemessenen Konzentrationen, bei der 50% der Hefen abgetötet worden sind, wurden mit 352,8 µg/mL ± 175,4 µg/mL (luminometrisch) und 79,5 µg/mL ± 29,5 µg/mL (nephelometrisch) berechnet (Tab. 6).

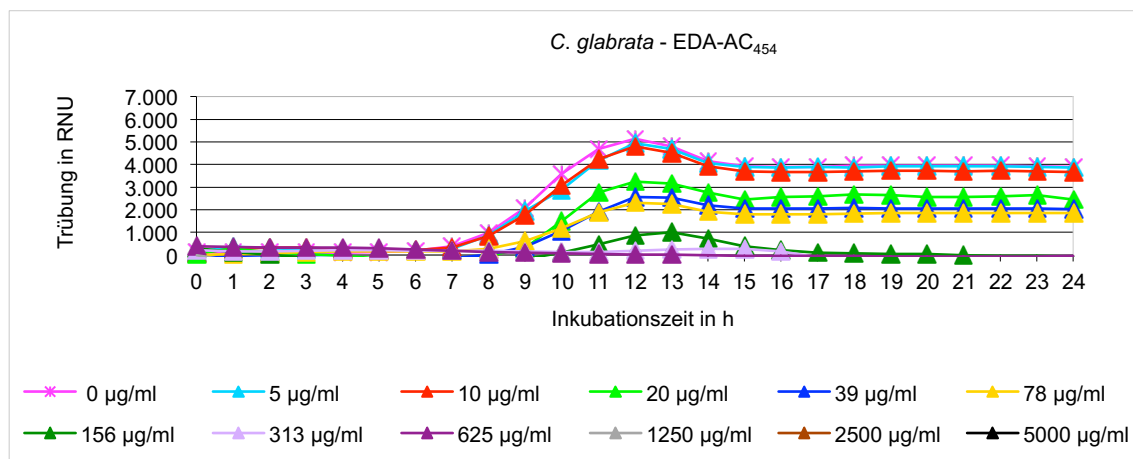


Abb. 5.17 Nephelometrische Untersuchung von *C. glabrata* unter dem Einfluss der EDA-AC₄₅₄.

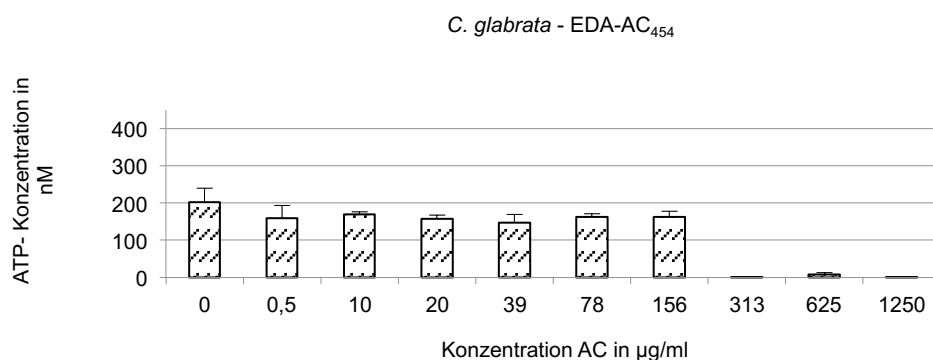


Abb. 5.18 Luminometrische Untersuchung von *C. glabrata* unter dem Einfluss der EDA-AC₄₅₄.

5.10 Wachstum von *C. glabrata* unter dem Einfluss von EDA-AC₁₈₅₈

Mit steigender Konzentration der Aminocellulose EDA-AC₁₈₅₈ ist in der nephelometrischen Untersuchung ein Rückgang des Wachstums von *C. glabrata* erkennbar. Ab der Konzentration von 78 µg/mL bleibt ein Wachstum aus (Abb. 5.19). Bei der Überimpfung der Mikroorganismen auf SDA-Platten zeigte sich kein Wachstum ab einer Konzentration der AC von 2500 µg/mL. Bei dieser Konzentration von 2500 µg/mL konnte somit eine fungizide Wirkung nachgewiesen werden (Tab. 7). Luminometrisch liegt die wachstumshemmende Konzentration bei 625 µg/mL (Abb. 5.20). Die IC₅₀-Werte für Luminometrie und Nephelometrie betragen 389,45 µg/mL ± 28,85 µg/mL und 23,5 µg/mL ± 13,5 µg/mL (Tab. 6).

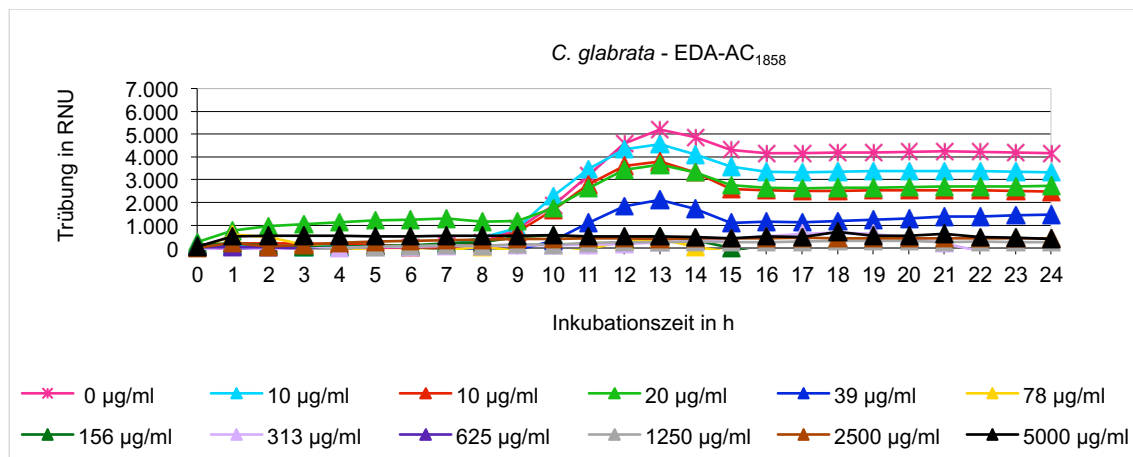


Abb. 5.19 Nephelometrische Untersuchung von *C. glabrata* unter dem Einfluss der EDA-AC₁₈₅₈.

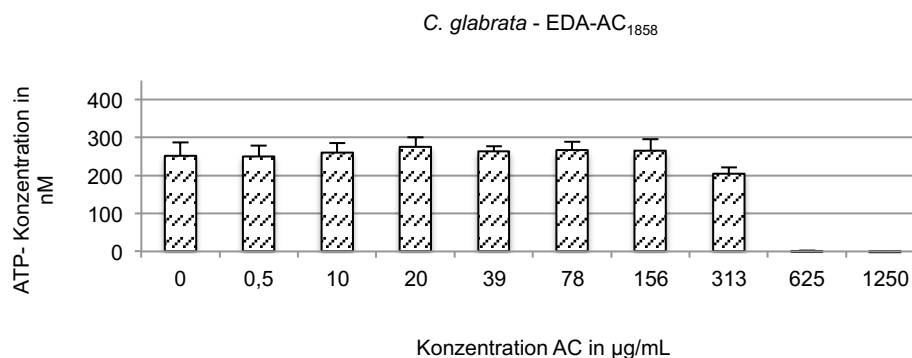


Abb. 5.20 Luminometrische Untersuchung von *C. glabrata* unter dem Einfluss der EDA-AC₁₈₅₈.

Ergebnisse

5.11 Wachstum von *C. krusei* unter dem Einfluss von EDA-AC₅₀

EDA-AC₅₀ zeigte in der Nephelometrie eine wachstumshemmende Wirkung auf *C. krusei*. Mit zunehmender AC-Konzentration nimmt das Wachstum sukzessiv ab. Oberhalb von 78 µg/ml war kein Wachstum von *C. krusei* unter dem Einfluss von EDA-AC₅₀ erkennbar (Abb. 5.21). Nach Überimpfung und Anzucht der Hefen auf SDA-Platten blieb eine Koloniebildung ab 313 µg/mL AC-Konzentration aus (Tab. 7). Ein ähnliches Bild zeichnete sich im Diagramm der Luminometrie ab. Bei einer AC-Konzentration von 156 µm/L sind nur noch geringe Mengen ATP nachweisbar und bei höheren Konzentrationen wurden alle Hefezellen gehemmt (Abb. 5.22). Die berechneten IC₅₀ betragen für die Luminometrie 144,55 µg/mL ± 1,45 µg/mL und in der Nephelometrie 26 µg/mL ± 17 µg/mL (Tab. 6).

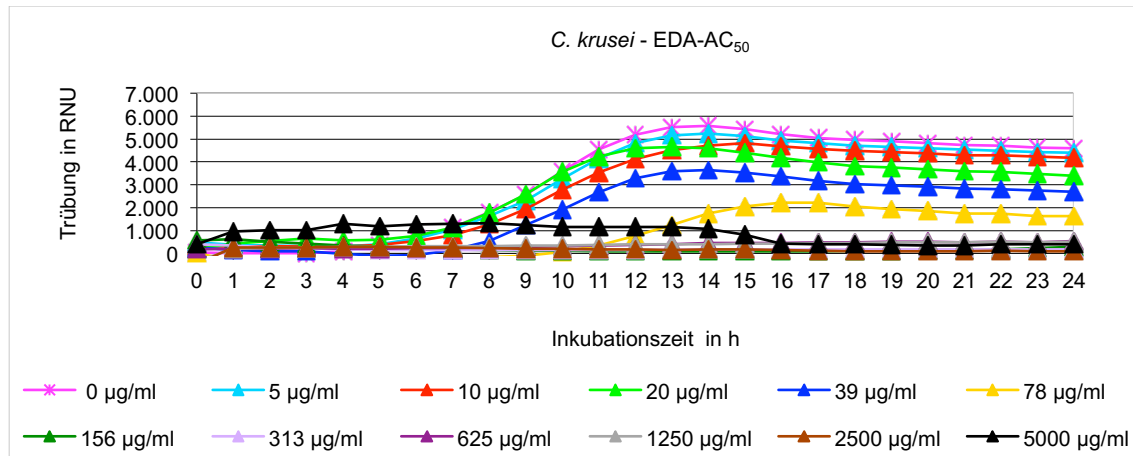


Abb. 5.21 Nephelometrische Untersuchung von *C. krusei* unter dem Einfluss der EDA-AC₅₀.

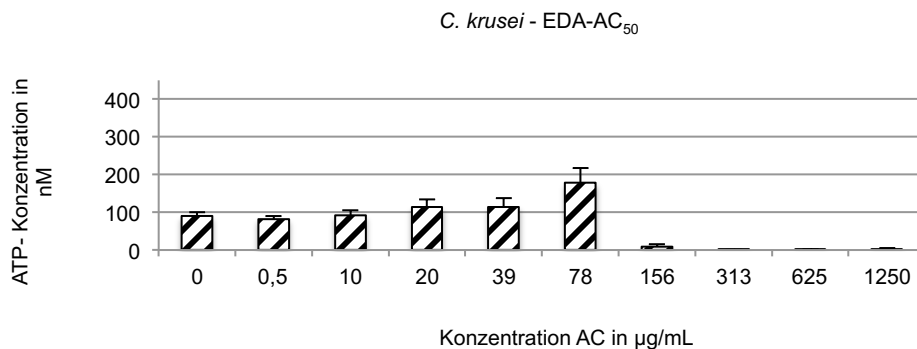


Abb. 5.22 Luminometrische Untersuchung von *C. krusei* unter dem Einfluss der EDA-AC₅₀.

5.12 Wachstum von *C. krusei* unter dem Einfluss von EDA-AC₁₁₁

In der nephelometrischen Untersuchung zeigte sich bei der EDA-AC₁₁₁ ebenfalls mit zunehmender Konzentration eine Hemmung des Wachstums von *C. krusei* und ab einer Konzentration von 156 µg/mL war kein Wachstum zu beobachten (Abb. 5.23). Bei der Überimpfung der AC Konzentrationen auf SDA-Agarplatten konnte ab einer Konzentration von 313 µg/mL eine fungizide Wirkung nachgewiesen werden (Tab. 7).

Bei dem luminometrischen Messverfahren ist bis zu einer Konzentration von 1250 µg/mL ATP nachweisbar. Jedoch ist ab einer AC-Konzentration von 313 µg/mL ein deutlicher Abfall der ATP-Konzentration zu erkennen (Abb. 5.24). Die IC₅₀-Werte betragen für die Luminometrie 226,4 µg/mL ± 48,4 µg/mL und für die Nephelometrie 21,5 µg/mL ± 0,5 µg/mL (Tab. 6).

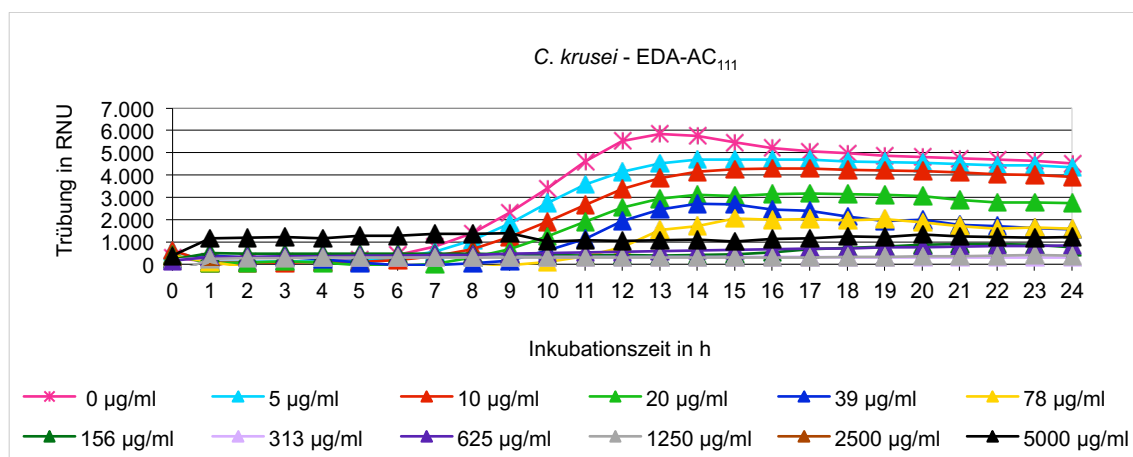


Abb. 5.23 Nephelometrische Untersuchung von *C. krusei* unter dem Einfluss der EDA-AC₁₁₁.

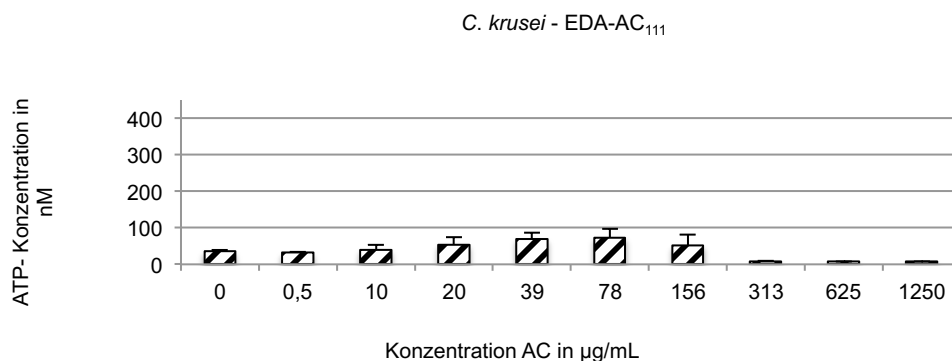


Abb. 5.24 Luminometrische Untersuchung von *C. krusei* unter dem Einfluss der EDA-AC₁₁₁.

Ergebnisse

5.13 Wachstum von *C. krusei* unter dem Einfluss von EDA-AC₃₃₀

Nephelometrisch ist eine Hemmung des Wachstums von *C. krusei* ab einer Konzentration von 156 µg/mL der EDA-AC₃₃₀ zu erkennen (Abb. 5.25). Ab einer Konzentration von 2500 µg/mL lag nach Überimpfung und Anzucht der Mikroorganismen auf SDA-Platten eine fungizide Wirkung vor (Tab. 7).

Bei der Lumineszenzmessung konnte ab einer Konzentration von 313 µg/mL kein ATP mehr detektiert werden (Abb. 5.26). Für die beiden Untersuchungsmethoden wurden IC₅₀-Werte von 170 µg/mL ± 0 µg/mL (luminometrisch) und 23 µg/mL ± 5 µg/mL (nephelometrisch) bestimmt (Tab. 6).

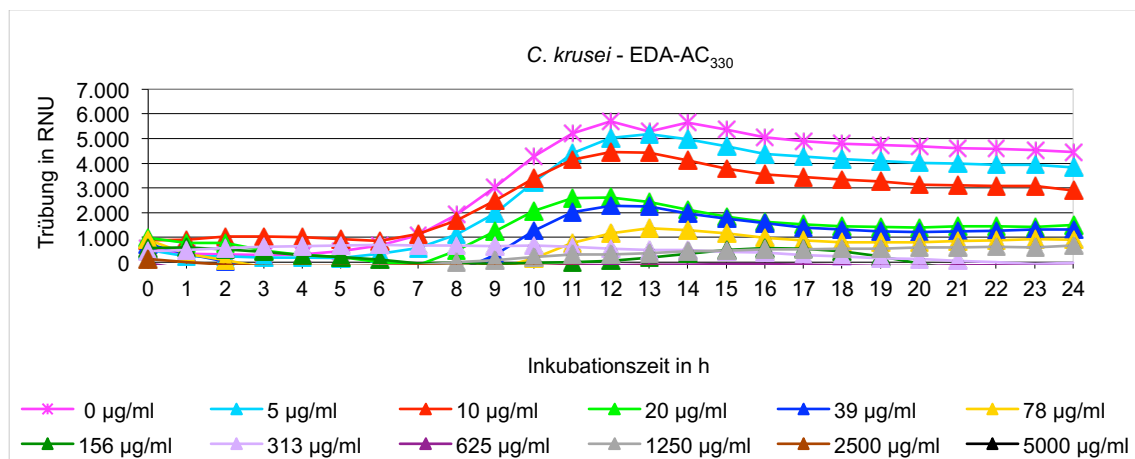


Abb. 5.25 Nephelometrische Untersuchung von *C. krusei* unter dem Einfluss der EDA-AC₃₃₀.

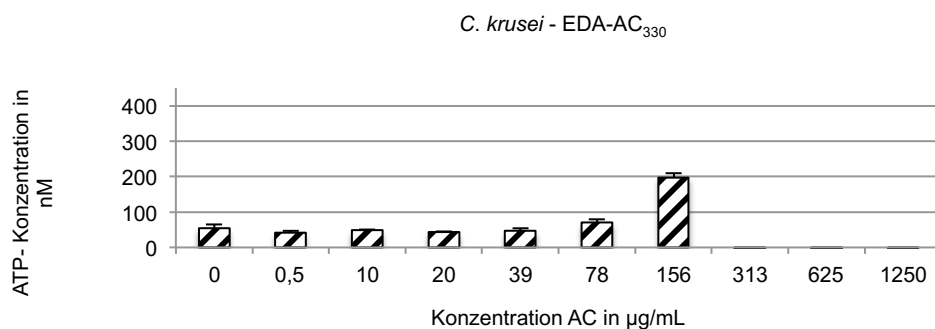


Abb. 5.26 Luminometrische Untersuchung von *C. krusei* unter dem Einfluss der EDA-AC₃₃₀.

5.14 Wachstum von *C. krusei* unter dem Einfluss von EDA-AC₄₅₄

EDA-AC₄₅₄ übte in der nephelometrischen Untersuchung mit zunehmender Konzentration eine stärker werdende Hemmung auf *C. krusei* aus. Ab einer AC-Konzentration von 625 µg/mL konnte kein Wachstum mehr nachgewiesen werden. (Abb. 5.27). Nach der Überimpfung und Anzucht der Hefen auf SDA-Platten zeigte sich eine fungizide Wirkung ab 1250 µg/mL AC-Konzentration (Tab. 7).

Bei der Lumineszenzmessung waren ab einer Konzentration von 625 µg/mL nur noch geringe ATP-Mengen nachweisbar (Abb. 5.28). Die IC₅₀-Werte betragen für die Luminometrie 587,95 µg/mL ± 13,45 µg/mL und für die Nephelometrie 95 µg/mL ± 18 µg/mL (Tab. 6).

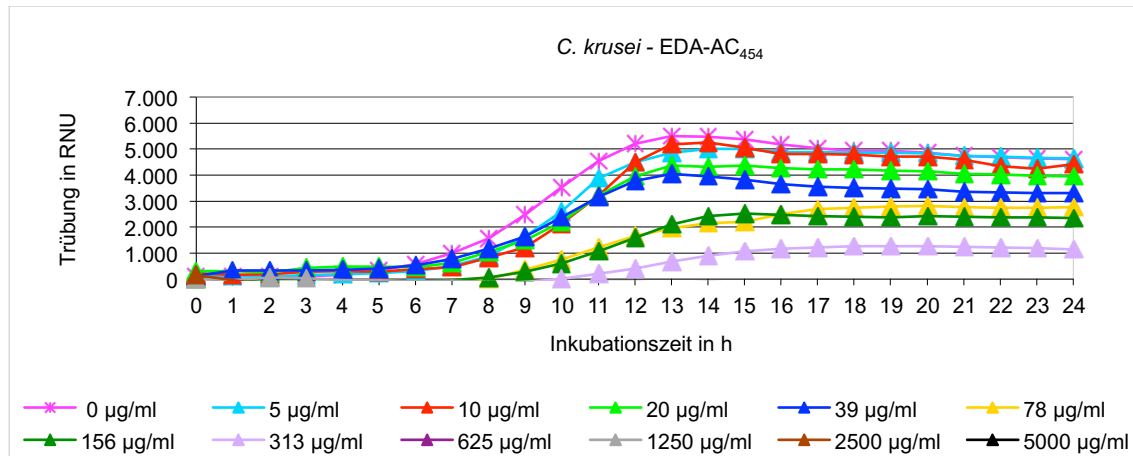


Abb. 5.27 Nephelometrische Untersuchung von *C. krusei* unter dem Einfluss der EDA-AC₄₅₄.

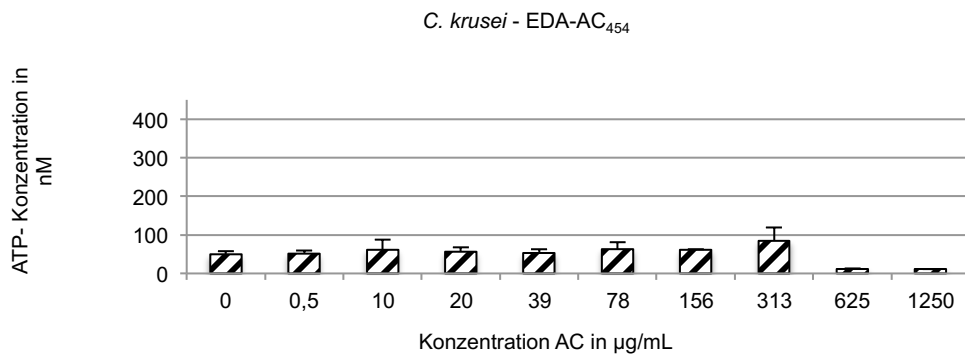


Abb. 5.28 Luminometrische Untersuchung von *C. krusei* unter dem Einfluss der EDA-AC₄₅₄.

Ergebnisse

5.15 Wachstum von *C. krusei* unter dem Einfluss von EDA-AC₁₈₅₈

Die nephelometrische Untersuchung zeigt, dass *C. krusei* bei steigender EDA-AC₁₈₅₈ Konzentration sensibel reagiert. Zwischen 10 µg/mL und 20 µg/mL ist bereits ein deutlicher Rückgang des Wachstums zu erkennen. Eine völlige Wachstumshemmung tritt ab einer Konzentration von 313 µg/mL auf (Abb. 5.29). Ab einer EDA-AC₁₈₅₈ Konzentration von 1563 µg/mL lag nach Überimpfung und Anzucht der Hefen auf SDA-Platten eine fungizide Wirkung vor (Tab. 7).

Bei der luminometrischen Messung waren ab 313 µg/mL nur noch geringe Mengen ATP nachweisbar (Abb. 5.30). Es wurden IC₅₀-Werte von 285,2 µg/mL ± 0,3 µg/mL (luminometrisch) und 22 µg/mL ± 9 µg/mL (nephelometrisch) berechnet (Tab. 6).

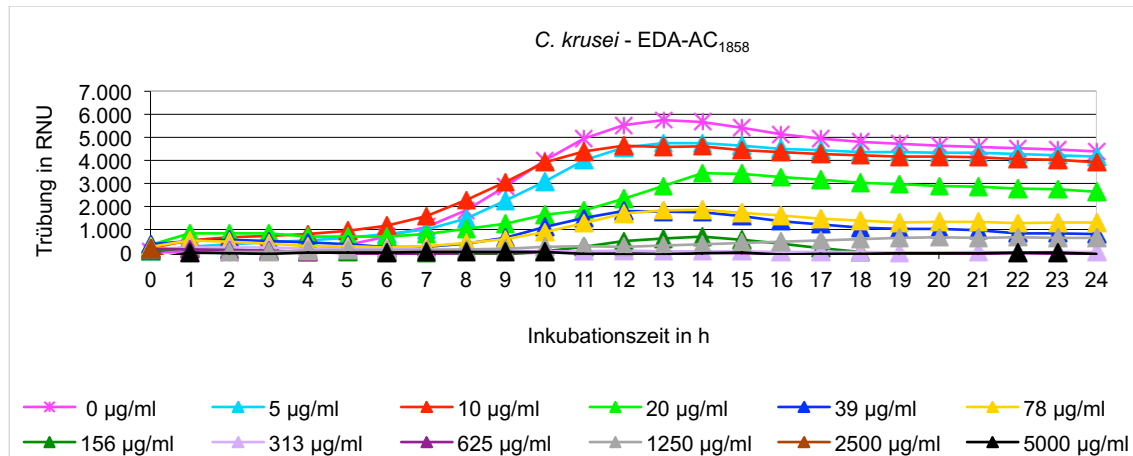


Abb. 5.29 Nephelometrische Untersuchung von *C. krusei* unter dem Einfluss der EDA-AC₁₈₅₈.

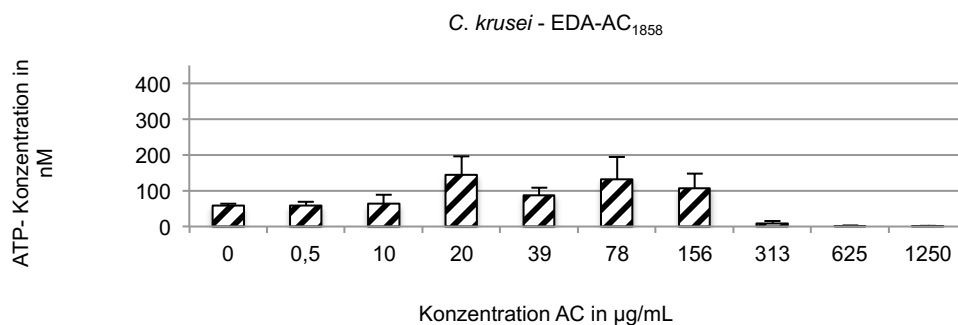


Abb. 5.30 Luminometrische Untersuchung von *C. krusei* unter dem Einfluss der EDA-AC₁₈₅₈.

5.16 Vergleich der IC_{50} -Werte anhand der luminometrischen und nephelometrischen Untersuchungen

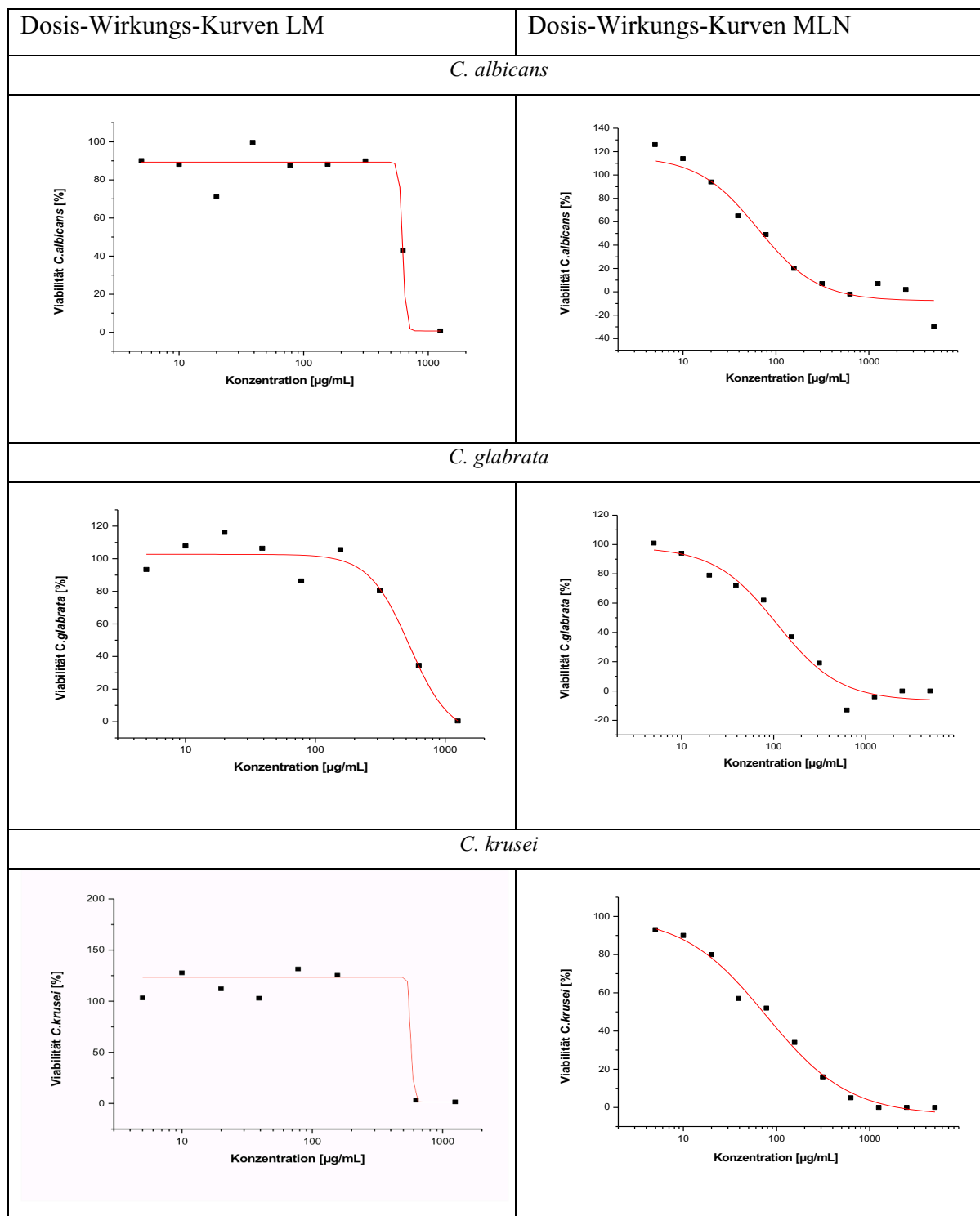
In Tabelle 5 ist eine Gegenüberstellung ausgewählter Dosis-Wirkungs-Kurven aufgeführt. Die Kurven wurden anhand der Ergebnisse beider Messmethoden erstellt und dienten zur Ermittlung der IC_{50} -Werte. Es werden beispielhaft die Ergebnisse für EDA-AC₄₅₄ dargestellt. Tabelle 6 zeigt die Mittelwerte der IC_{50} -Werte aus beiden Messreihen ($n=2$), welche mithilfe der Software OriginLab anhand der Ergebnisse beider Messmethoden bestimmten wurden. Hinter den Mittelwerten sind die jeweiligen Standardabweichungen zu finden (\pm)(Tab. 6).

In den Textabschnitten 5.1 bis 5.15 wurden bereits die IC_{50} -Werte für die jeweilige Untersuchung aufgeführt. **Für die beiden Aminocellulosen EDA-AC₅₀ und EDA-AC₁₁₁ konnten anhand der Ergebnisse aus der Luminometrie die niedrigsten IC_{50} -Werte berechnet werden. So hemmten diese Aminocellulosen das Wachstum aller *C. spp* in einem Bereich von etwa 145 $\mu\text{g/mL}$ bis 230 $\mu\text{g/mL}$.** Dabei war EDA-AC₅₀ am effektivsten gegen *C. krusei* (145 $\mu\text{g/mL}$) wirksam. Für die anderen AC wurden höhere IC_{50} -Werte bestimmt (290 $\mu\text{g/mL}$ – 626 $\mu\text{g/mL}$). Hierbei bildete EDA-AC₃₃₀ eine Ausnahme gegenüber *C. krusei* ($IC_{50} = 170 \mu\text{g/mL}$).

Bei der Mikrotiterplattenlasernephelometrie konnte für alle AC, mit Ausnahme von EDA-AC₄₅₄, niedrige IC_{50} -Wert ein Bereich von 13,5 $\mu\text{g/mL}$ bis 26 $\mu\text{g/mL}$ ermittelt werden. Dabei konnte für die EDA-AC₄₅₄ ein deutlicher Unterschied in der Wirkung gegen die einzelnen *Candida* Spezies beobachtet werden (IC_{50} -Werte von 65 $\mu\text{g/mL}$ bis 95 $\mu\text{g/mL}$).

Ergebnisse

Tab. 5 Dosis-Wirkungs-Kurven für EDA-AC₄₅₄.



Ergebnisse

Tab. 6 Übersicht der ermittelten IC₅₀-Werte (Mittelwerte aus beiden Messreihen (n=2) in µg/mL).

	<i>C. albicans</i>		<i>C. glabrata</i>		<i>C. krusei</i>	
	Luminometrie	Nephelometrie	Luminometrie	Nephelometrie	Luminometrie	Nephelometrie
EDA-AC ₅₀	187,15 ± 28,35	21 ± 2	203,45 ± 7,25	21,5 ± 0,5	144,55 ± 1,45	26 ± 17
EDA-AC ₁₁₁	215,35 ± 3,05	16,5 ± 2,5	172,4 ± 17,4	13,5 ± 1,5	226,4 ± 48,4	21,5 ± 0,5
EDA-AC ₃₃₀	290,45 ± 23,55	21 ± 2	321,1 ± 12,1	19 ± 11	170,1 ± 0	23 ± 5
EDA-AC ₄₅₄	592,1 ± 31,2	65 ± 1	352,8 ± 175,4	79,5 ± 29,5	587,95 ± 13,45	95 ± 18
EDA-AC ₁₈₅₈	625,55 ± 42,85	22 ± 5	389,45 ± 28,85	23,5 ± 13,5	285,2 ± 0,3	22 ± 9

5.17 Überprüfung der antimykotischen Wirkung auf SDA-Platten

Tabelle 7 und Abb. 5.31 zeigen eine Aufstellung der fungiziden AC-Konzentrationen, die anhand der Überimpfung und Anzucht der Hefen auf SDA-Platten, im Anschluss an die nephelometrische Untersuchung bestimmt wurden. Die fungiziden AC-Konzentrationen stammen aus zwei durchgeführten Messreihen und wurden für die gleichen *Candida* Spezies und AC gemittelt.

C. albicans und *C. krusei* reagierten von den untersuchten *Candida spp.* am sensibelsten auf die AC. EDA-AC₅₀ und EDA-AC₁₁₁ bewirkten bereits ab einer Konzentration von 313 µg/mL eine vollständige Wachstumshemmung auf *C. krusei*. Für *C. albicans* konnte ab einer EDA-AC₁₁₁-Konzentration von 625 µg/mL eine vollständige Hemmung des Wachstums erzielt werden, d. h., dass bei dieser Konzentration Fungizität vorliegt. Für *C. glabrata* wurden höhere AC-Konzentrationen zum Erreichen einer fungiziden Wirkung benötigt. Die geringste fungizide Wirkung zeigte EDA-AC₁₁₁ gegenüber *C. glabrata*, in diesem Fall waren durchschnittlich 3125 µg/mL notwendig.

Tab. 7 Zusammenfassung der fungiziden AC-Konzentrationen (Angabe der Mittelwerte in µg/mL).

	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. krusei</i>
EDA-AC ₅₀	938	938	313
EDA-AC ₁₁₁	625	3125	313
EDA-AC ₃₃₀	1250	2500	2500
EDA-AC ₄₅₄	1250	2500	1250
EDA-AC ₁₈₅₈	1875	2500	1563

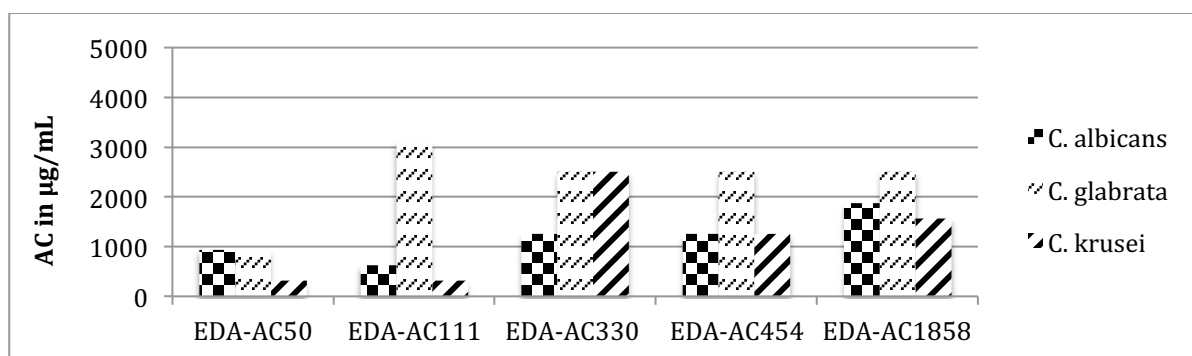


Abb. 5.31 Vergleich der fungiziden AC-Konzentrationen (Angabe der Mittelwerte in µg/mL).

6 Diskussion

6.1 Antifungale Wirkung der Aminocellulosen auf die *Candida* Spezies *C. albicans*, *C. glabrata* und *C. krusei*

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Methoden zum Nachweis der antimikrobiellen Wirkung von unterschiedlichen AC angewendet. Bei den beiden Methoden handelt es sich um die Nephelometrie und die Luminometrie. Beide Methoden sind geeignet, um mikrobielles Wachstum unter dem Einfluss antimikrobieller Substanzen zu untersuchen. Sie unterscheiden sich jedoch in ihrem Verfahren und anhand der zu messenden Parameter (Hipler, Brand et al. 2003, Finger, Wiegand et al. 2012). Um eine Aussage treffen zu können, ob eine AC-Konzentration eine fungistate oder sogar fungizide Wirkung ausprägt, wurde die Koloniebildung auf Sabouraud-Dextrose-Agarplatten als zusätzlicher Parameter hinzugezogen.

Die nephelometrisch und luminometrisch gewonnenen Daten wurden graphisch dargestellt und mithilfe der Software Origin wurden die inhibitorischen Konzentrationen (IC_{50}) ermittelt, bei denen 50% der Hefen abgetötet wurden. Hilfreich ist die IC_{50} um die Ergebnisse der Verwendeten Methoden zu vergleichen. Ferner ist der Vergleich von IC_{50} aus anderen wissenschaftlichen Arbeiten, welche sich mit AC oder anderen antimikrobiellen Agens beschäftigen, möglich (Finger, Wiegand et al. 2012).

AC-Konzentrationen, die in den nephelometrischen Untersuchungen komplette Wachstumshemmung aufwiesen, wurden auf Agarplatten ausplattiert und nach 24-stündiger Inkubation im Brutschrank auf Hefewachstum untersucht. Dieses Verfahren wurde in dieser Arbeit als Überprüfung bezeichnet (siehe Kapitel 4.7). Auf diese Weise konnte die experimentell nachweisbare Anwesenheit von Wachstum, sowie ATP-Gehalt von Hefen, mit makroskopisch sichtbarer Koloniebildung in Beziehung gesetzt werden.

In der Überprüfung war ab einer AC-Konzentration von 313 $\mu\text{g/mL}$ eine fungizide Wirkung nachweisbar. EDA- AC_{50} und EDA- AC_{111} zeigten hier durchschnittlich die effektivste antimikrobielle Wirkung. EDA- AC_{111} hebt sich mit seiner gering ausgeprägten fungiziden Wirkung gegenüber *C. glabrata* (3125 $\mu\text{g/mL}$) deutlich von allen übrigen Werten ab. EDA- AC_{330} , EDA- AC_{454} und EDA- AC_{1858} zeigten bei den Konzentrationen 1250 $\mu\text{g/mL}$ bis 2500 $\mu\text{g/mL}$ fungizide Wirkung. Bei dem Vergleich der Reaktionen von *C. glabrata* auf die fünf untersuchten AC stellt sich heraus, dass bei vier AC die eingesetzten AC-

Konzentrationen 1,3 bis 10 mal so hoch sind wie bei *C. albicans* und *C. krusei*. Lediglich bei EDA-AC₅₀ weist *C. glabrata* dieselbe Sensibilität wie *C. albicans* auf. *C. krusei* reagiert bereits bei einem Drittel der AC Konzentration mit Abwesenheit von Wachstum. Die Potenz von EDA-AC₅₀ wird in der Abb. 5.31 deutlich. EDA-AC₁₈₅₈ scheint insgesamt die schwächste Fungizität auf Basis der Koloniebildung auf Agarplatten aufzuweisen. (Tab. 7; Abb. 5.31).

Bei den nephelometrisch erfassten Daten ist der Einfluss der AC schon in geringen Konzentrationsbereichen (5 µg/mL bis 20 µg/mL) sichtbar, eine vollständige Wachstumshemmung tritt zwischen 156 µg/mL und 625 µg/mL auf. Der Konzentrationsbereich, in dem die Wachstumshemmung auftritt, entspricht etwa der Hälfte des Konzentrationsbereiches der LM (313 µg/mL - 1250 µg/mL). Die bestimmten fungiziden Konzentrationen nach Überimpfung und Anzucht der Hefen auf Agarplatten waren gegenüber der MLN bis zu fünfmal höher (313 µg/mL – 3125 µg/mL) (Tab.7). Die hemmenden Konzentrationsbereiche der LM (313 µg/mL - 1250 µg/mL) und Überprüfung (313 µg/mL - 3125 µg/mL) überschneiden sich in einem Bereich von 313 µg/mL bis 1250 µg/mL.

EDA-AC₅₀, EDA-AC₁₁₁, EDA-AC₃₃₀ und EDA-AC₁₈₅₈ hatten die beste Wirkung gegen *Candida spp.* in MLN sowie in LM. Die geringste antimikrobielle Wirkung zeigte EDA-AC₄₅₄ (Abb. 7.1, Abb. 7.2, Abb.6.8, Abb. 6.9 Abb. 6.10).

Diese Beobachtungen können zu dem Schluss führen, dass ein hoher Grad der Polymerisation, in Kombination mit einer geringen Funktionalisierung, eine eher schwache antimikrobielle Potenz ausprägt. Im Gegensatz dazu scheint eine kurzkettige AC wie EDA-AC₅₀ mit eher hoher Funktionalisierung in allen Messverfahren eine deutliche Fungizität zu bedingen.

Die Ergebnisse der Biolumineszenz (LM) zeigen bei Gegenüberstellung beider Messreihen reproduzierbare Ergebnisse mit ähnlichen Hemmkonzentrationen sowie AC abhängigen, charakteristischen ATP Werten in der graphischen Darstellung. Reproduzierbare Werte ließen sich v.a. bei *C. albicans* beobachten. Die beiden folgenden Luminometriemessungen sind beispielhaft (Abb. 6.1, Abb. 6.2).

Diskussion

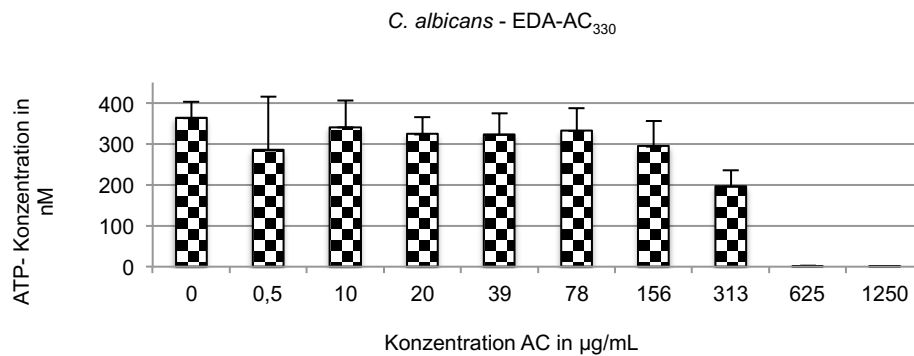


Abb. 6.1 *C. albicans* luminometrische Messung 1

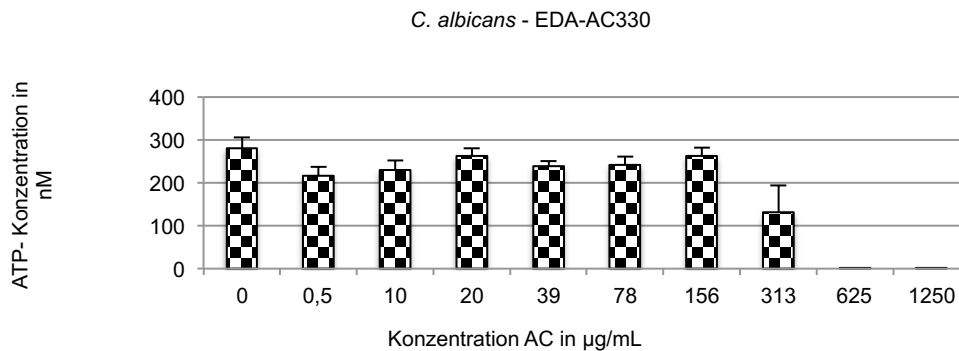


Abb. 6.2 *C. albicans* luminometrische Messung 2

Bei *C. glabrata* und *C. krusei* wichen die gemessenen ATP Werte im Messreihenvergleich häufiger voneinander ab als bei *C. albicans* (Abb. 6.3, 6.4). Alle erhobenen Daten wurden mit dem Biolumineszenztest Bactiter Glo™, der Firma ProMega durchgeführt. Die Verunreinigung der Proben mit ATP durch die Haut wurde durch Latexhandschuhe minimiert. Dieser Test ist v. a. für Bakterienzellen ausgelegt. In der Produktbeschreibung wird darauf hingewiesen, dass zur Viabilitätsmessung des Hefepilzes *C. albicans* eine deutlich längere Inkubationszeit (15 Min.) benötigt wird als bei Bakterien (7 Min.). Die längere Einwirkzeit des Reagenz ist auf die unterschiedliche Dicke bzw. den Aufbau von Bakterien- und Pilzzellwand zurückzuführen. Der genaue Vorgang der ATP Freisetzung aus den Zellen durch einen spezifischen Bestandteil des Reagenz wird nicht beschrieben (Promega 2012). Die ATP – Bestimmung anderer Hefezellen wie *C. glabrata* und *C. krusei* wird ebenfalls nicht beschrieben. Die Abweichung in den Messreihen von *C. glabrata* und *C. krusei* könnte darauf zurückzuführen sein, dass das Reagenz nicht speziell auf die Bedingungen

von Hefen abgestimmt ist. Die fehlende Genauigkeit der Reagenzien von Biolumineszenztests, in Bezug auf bestimmte Bakterien oder Hefen finden auch Erwähnung in der Arbeit von M. Lafond et al., der verschiedene Biolumineszenztests bei der Untersuchung von Bakterien und Hefen verwendete (Lafond, Vidal et al. 2010). Aufgrund der Arbeit von Finger et al. 2012, die sich mit der antimikrobiellen Eigenschaft von unterschiedlichen antiseptischen Cyclodextrinkomplexen beschäftigte, zeigte sich in einer 48 Stunden Endpunktmessung u.a. ein ähnlicher Wertebereich der ATP Konzentrationen (400-600 nM) und damit Plausibilität der in dieser Arbeit gewonnen Daten (Finger, Wiegand et al. 2012). Eine mögliche Beeinflussung der ATP-Messung in der LM, durch die vorhergehende 24 stündige MLN soll an dieser Stelle bedacht werden. Nach einer 24 stündigen Inkubation von AC, SGB und *C. spp.* in einer MTP, könnte, aufgrund einer insuffizienten Nährstoffversorgung, einen Einfluss auf den ATP- Gehalt in der Biolumineszenzmessung, unabhängig von der AC-Konzentration, zur Folge haben. Dieses Phänomen würde sich auch auf die Wachstumskontrolle auswirken.

Untersuchungen von Wiegand et al. zeigen, wie hoch ATP-Messungen in einem anderen Versuchsaufbau sein können (> 50000 nM). In dieser Arbeit wurde die Biokompatibilität sowie die Zytotoxizität von AC auf Keratinozyten getestet (Wiegand, Nikolajski et al. 2015). Unter Berücksichtigung der Diversität von Hefe- und Bakterien Zellwänden (Hof und Dörries 2014) ist eine genauere Untersuchung der Effektivität von ATP-Biolumineszenztests nötig. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob AC auf den zellulären ATP-Stoffwechsel einen Einfluss haben könnte. Diese Frage wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Allerdings erlauben die erhobenen Daten eine Aussage über den Einfluss der AC auf das luminometrische Messverfahren zu treffen. Leerwerte der AC-Konzentrationen in SGB zeigen bei ansteigender AC Konzentrationen keine proportionale Reduktion der RLU.

Diskussion

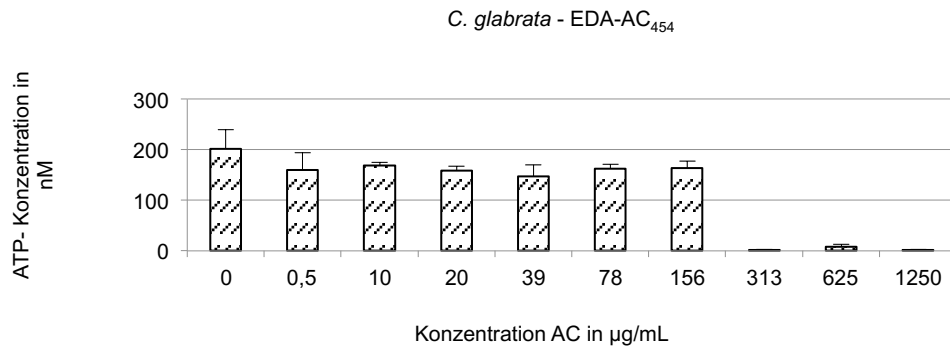


Abb. 6.3 *C. glabrata* luminometrische Messung 1

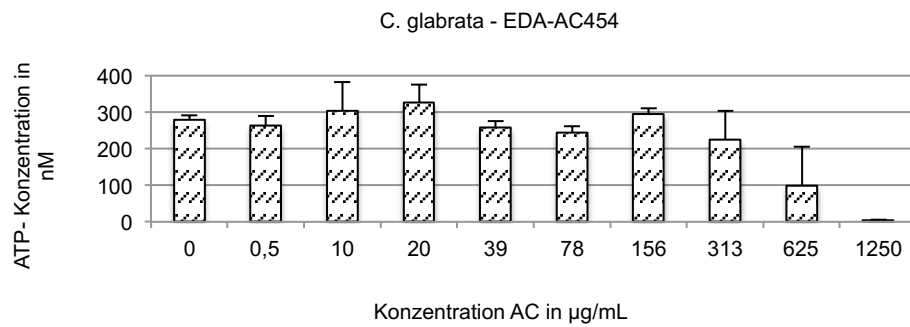


Abb. 6.4 *C. glabrata* luminometrische Messung 2

Die Qualität einer Messung ist zuerst abhängig von der manuellen Ausführung (Pipettieren, Handschuhe etc.). Im Folgenden ist eine beispielhafte ATP-Standardkurve dargestellt welche für jede Untersuchung kalibriert wurde (siehe Methodik)(Abb. 6.5).

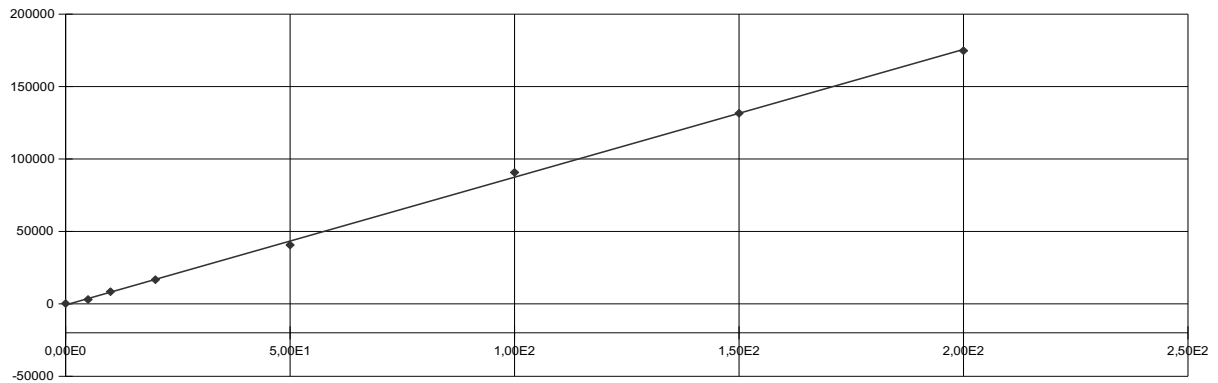


Abb. 6.5 ATP-Standardkurve *C. albicans* LM EDA-AC₁₁₁ (y-Achse Relative Luminometereinheiten (RLU); x-Achse ATP Gehalt in nM)

U.a. wiesen folgende Messungen schon bei einer AC-Konzentration von 313 µg/mL nur noch sehr geringe Mengen ATP auf:

- *C. albicans* mit EDA-AC₅₀ und EDA-AC₁₁₁
- *C. glabrata* mit EDA-AC₅₀, EDA-AC₁₁₁ und EDA-AC₄₅₄
- *C. krusei* mit EDA-AC₅₀, EDA-AC₁₁₁, EDA-AC₃₃₀, sowie EDA-AC₁₈₅₈

In der höchsten AC Hemmkonzentration, die in der Luminometrie untersucht wurde (1250 µg/mL AC), konnten in zwei Fällen geringe Mengen ATP nachgewiesen werden:

- *C. krusei* EDA-AC₁₁₁ sowie EDA-AC₄₅₄

Für *C. krusei* zeigte sich nach Überimpfung und Anzucht auf SDA-Platten eine fungizide Wirkung bei EDA-AC₁₁₁ ab einer Konzentration von 313 µg/mL und EDA-AC₄₅₄ ab 1250 µg/mL. Obwohl in den aufgeführten Messungen noch geringe Mengen an ATP nachgewiesen werden konnten, blieb eine Koloniebildung in den Überprüfungen aus. Möglicherweise gibt es hierfür zwei Ursachen. Die Überimpfung auf Agarplatten fand „stichprobenartig“ aus einer horizontalen Wellreihe statt (Abb. 4.7). Die wachstumshemmende Konzentration der Überprüfung spiegelt nur die Verhältnisse einzelner Wells wieder. Das heißt es stehen für die Auswertung der Überprüfung nur geringe Datenmengen zur Verfügung, so dass man hier nur zurückhaltend diskutieren kann.

Tatsächlich zeigen jedoch die Rohdaten bei näherer Betrachtung, dass speziell in dem Well C8 (*C. krusei* und EDA-AC₁₁₁) und im Well C10 (*C. krusei* und EDA-AC₄₅₄) RLU-Werte gemessen wurden, die geringfügig über den RLU-Werten der Leerwert-Kontrolle (AC -

Verdünnungsreihe in Sabouraud-Glukose-Boullion ohne Hefen) liegen. So kann von einer geringen Mengen ATP ausgegangen werden. Das bedeutet auch, dass zumindest in diesen beiden Fällen, auf den Agarplatten trotz Nachweis von ATP, kein Wachstum stattfand. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass mit der Überimpfung der Hefen, AC auf die Agarplatten übertragen wurde, welche eine Koloniebildung hemmte. Es sollte noch erwähnt werden das es sich bei den genannten Untersuchungen um ATP-Werte $< 11 \text{ nM}$ handelt. Die meisten anderen Untersuchungen zeigen entweder:

.....dass die luminometrisch gemessene Abwesenheit von ATP einer bestimmten Hemmkonzentration mit einem Ausbleiben der Koloniebildung in der Überprüfung einhergeht. Dies gilt für die folgenden Beispiele...

- *C. albicans* mit EDA-AC₁₁₁
- *C. albicans* mit EDA-AC₄₅₄
- *C. krusei* mit EDA-AC₅₀

..... oder, dass bei Abwesenheit von ATP Koloniebildung zu beobachten ist. Dies gilt für die folgenden Beispiele...

- *C. albicans* mit EDA-AC₅₀
- *C. glabrata* mit EDA-AC₁₈₅₈
- *C. krusei* mit EDA-AC₃₃₀

Letzteres wirft die Frage auf, wie bei scheinbarer Abwesenheit von ATP, Wachstum entstehen kann. Hierzu konnte M. Lafond et al. einen interessanten Ansatz liefern. Bei der Untersuchung von verschiedenen Biolumineszenztests u.a. mit *C. albicans* beschrieb er ruhende Zellen (dormant cells), mit geringem Metabolismus, die sich dem Nachweis des Biolumineszenztests entzogen (Lafond, Vidal et al. 2010).

In einigen Biolumineszenzmessungen in der vorliegenden Arbeit war ein ATP Anstieg bei steigender AC - Hemmkonzentration zu beobachten, bis es zu einem abrupten Abfalls des ATP kommt (Abb. 6.6). Mit ansteigender AC-Konzentration zeigten sich in der MLN eine zunehmende Wachstumshemmung, sodass nach 24 stündiger Messung durch das „gebremste Wachstum“ in mittleren bis höheren, jedoch nicht vollständig hemmenden

AC-Konzentrationen auch höhere Konzentrationen Nährstofflösung verblieben sein könnte. Dieses könnte zu einer verlängerten Log - Phase führen. So kämen durch mittlere und höhere AC-Konzentrationen, in einem Zwischenbereich von ungehemmtem und inhibiertem Wachstum, höhere ATP Werte in der LM zustande.

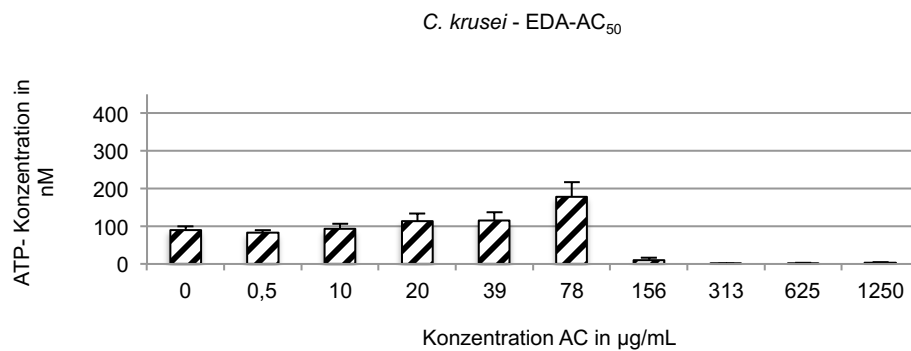


Abb. 6.6 *C. krusei* EDA-AC₅₀. Beispiel für einen ATP- Anstieg.

Die MLN gilt als sensitives Verfahren zum Monitoring des Wachstums von Mikroorganismen (Hipler, Brand et al. 2003, Fouda, Knittel et al. 2006, Seyfarth, Schliemann et al. 2008, Finger, Wiegand et al. 2012).

In dieser Arbeit wurde festgestellt, dass die MLN zur Untersuchung des Einflusses von Aminocellulosen auf *Candida spp.* über eine Messzeit von 24 Stunden geeignet ist. Ferner kann mithilfe der MLN in der 24 Stunden Messung ein charakteristisches Bild des Wachstumsverhaltens der einzelnen Hefespezies betrachtet werden.

In dieser Arbeit wurden drei verschiedene Untersuchungsmethoden miteinander verglichen.

Grundsätzlich lieferten alle Messverfahren zufriedenstellende und übereinstimmende Ergebnisse. Die Trübungsmessung der Nephelometrie und die Koloniebildung auf Agarplatten betrachten das Wachstum von Hefen in Gegenwart von Hemmstoffen. Mit der Lumineszenz wird durch den ATP Nachweis metabolische Stoffwechselaktivität erfasst. Die Abweichungen des inhibitorischen Konzentrationsbereiches der MLN gegenüber den beiden anderen Verfahren (LM, Überprüfung) deutet darauf hin, dass die Untersuchung absoluter Hemmkonzentrationen mit den zuletzt genannten Methoden in diesem Versuchsaufbau genauer zu bestimmen sind. Vor diesem Hintergrund sollen die Grenzen der Nephelometrie näher betrachtet werden.

Hohe AC Konzentrationen wirken sich möglicherweise auf das Trübungsverhalten der Suspension aus AC und Sabouraud Glucose Lösung (SGB) aus und nehmen Einfluss auf die Lichtstreuung welche vom Lasers des Nephelometers detektiert wird. Dies führt zu hohen Blank-Werten (AC + SGB) der Abzug dieser hohen Leerwerte von den Proben könnte zu niedrigen Relativen Nephelometer Einheiten (RNU) führen, die sich im Ergebnis als zu niedrige Wachstumskurven darstellen würden. Im Folgenden zur Veranschaulichung ein Auszug aus den Rohdaten während der nephelometrischen Messung bei Stunde sechs bis acht. Bei Betrachtung von Reihe D11 und E11 wird deutlich, welchen Einfluss die AC auf das Trübungsverhalten der Suspension (AC+SGB) und die Messung Nephelometers ausübt. Sabouraud Glukose Lösung sowie Hefe verursachen eine vergleichsweise geringe Lichtstreuung (E01; F01) (Abb. 6.7).

Stunden		6	7	8	8
A11	CK+AC 1:2	6803	6739	6725	6713
B11	CK+AC 1:2	6944	6883	6860	6860
C11	CK+AC 1:2	6995	6908	6887	6855
D11	SGB+AC 1:2	5947	5879	5838	5831
E11	SGB+AC 1:2	6600	6527	6511	6514
F11	CK+AC 1:2	5532	5450	5406	5421
G11	CK+AC 1:2	6946	6857	6795	6764
H11	CK+AC 1:2	6945	6890	6874	6876
E01	SGB	721	708	710	713
F01	CK+SGB	712	799	970	1245

Abb. 6.7 Auszug Rohdaten Mikrotiterplattenlasernephelometrie.

Seyfarth et al. untersuchten ebenfalls mithilfe der Nephelometrie den Einfluss, eines weiteren polykationische Polysaccharid, dem Chitosan, auf *Candida spp.*. Während in der vorliegenden Arbeit Relative Nephelometer Einheiten (RNU) bis etwa 7000 gemessen wurden, stiegen die Wachstumskurven bei Seyfarth et al. bis 12000 RNU an. Eine Überimpfung der höchsten Hemmkonzentrationen auf Agarplatten wurde, wie in dieser Arbeit auch, vorgenommen. In der höchsten Hemmkonzentration konnte, in dieser nachfolgenden Überprüfung auf SDA-Platten nach 24 Stunden Inkubation, bei „high- and low- molecular weight chitosan Hydrochlorid“, mit der Ausnahme von *C. glabrata*, kein Wachstum beobachtet werden. In niedrigeren Hemmkonzentrationen konnte bei einigen Hefen Wachstum verzeichnet werden, obwohl zu einem Teil bereits in der Nephelometrie Wachstumshemmung ersichtlich war. Diese Diskrepanz von in vitro (MLN) und in vivo (Überprüfung auf

SDA-Platten nach 24 h MLN) Hemmkonzentrationen scheint in dieser Arbeit auch zum Tragen gekommen zu sein. Ob dies aus einer Beeinflussung des Trübungsverhaltens durch Chitosane entstand, wird in der Untersuchung nicht erklärt (Seyfarth, Schliemann et al. 2008).

Fouda et al. beschrieb in seiner Arbeit nephelometrisch Löslichkeitsverhalten von β -Cyclodextrincomplexen sowie deren antimykotischen Einfluss auf *C. albicans* und *C. krusei*. Dabei untersuchte er jeweils vier Hemmkonzentrationen über einen Zeitraum von 24 Stunden. Bei der Überprüfung der nephelometrisch ermittelten Hemmkonzentrationen fand ein Fluoreszenztest, welcher metabolische Aktivität misst, Anwendung. Geringe oder keine metabolische Aktivität konnten mikroskopisch unterschieden werden. Ob eine Beeinflussung des Trübungsverhaltens durch die verwendeten Cyclodextrinkomplexe stattfand, wird nicht diskutiert. (Fouda, Knittel et al. 2006).

Hinsichtlich der Hemmkonzentrationen die aus der MTP gewonnen wurden zeigt die Arbeit von Finger et al. vergleichbare Ergebnisse. Bei der nephelometrischen Untersuchung antimikrobieller Eigenschaften von Cyclodextrin-Antiseptika-Komplexe auf *C. albicans* und *M. pachydermatis* zeigen sich Wachstumskurven, die ihr Maximum bei etwa 8000 RNU erreichen. Finger et al. spricht von einer guten Vergleichbarkeit von LM und MLN. Jedoch werden die im Vergleich häufig niedrigeren Werte der MLN mit einem möglichen hyphalen Wachstum der Hefen in Verbindung gebracht. Dies ist ein weiterer Faktor der zu einer Beeinflussung der nephelometrischen Messung führen kann (Finger, Wiegand et al. 2012).

6.2 Vergleich der IC₅₀-Werte

Auch die aus der Nephelometrie und Luminometrie berechneten IC₅₀-Werte weichen in ihrer Größenordnung von einander ab (Tab.6, Abb. 6.8, Abb. 6.9, Abb.6.10).

Nephelometrisch zeigt sich anhand der errechneten IC₅₀-Werte, dass alle AC, ausgenommen von EDA-AC₄₅₄, zwischen 13,5 µg/mL und 26 µg/mL eine Hemmung des Hefenwachstums erzielen (mindestens fungistase). EDA-AC₄₅₄ benötigte zwei bis dreifach höhere Konzentrationen, zwischen 65 µg/mL und 95 µg/mL, um eine inhibitorischen Wirkung zu erzielen. Die untersuchten Hefen *C. albicans*, *C. glabrata* und *C. krusei* scheinen unter dem Einfluss der verschiedenen AC ähnlich zu reagieren. Diese Aussage deckt sich mit der Abb. 7.1 und 7.2, in der die durchschnittliche Wirkung der AC auf *C. spp.* in Abhängigkeit von Substitutions- und Polymerisationsgrad dargestellt ist (Abb. 7.1, 7.2).

Die IC₅₀-Werte, die durch Messungen mit Hilfe der LM bestimmt wurden, unterschieden sich gegenüber nephelometrisch bestimmten Werten. Die effektivste antimikrobielle Wirkung zeigten EDA-AC₅₀, EDA-AC₁₁₁ und EDA-AC₃₃₀ mit IC₅₀-Werten im Bereich von 145 µg/mL bis 321 µg/mL. EDA-AC₃₃₀ zeigte gegenüber *C. albicans* und *C. glabrata* eine geringere Wirkung, als EDA-AC₅₀ und EDA-AC₁₁₁. *C. krusei* erfährt durch EDA-AC₃₃₀, nach EDA-AC₅₀, die effektivste Hemmung.

EDA-AC₄₅₄ und EDA-AC₁₈₅₈ wiesen die geringste Wirkung auf. So wurden IC₅₀-Werte von 285 µg/mL bis 626 µg/mL berechnet. Von diesen AC zeigte EDA-AC₁₈₅₈ die beste Wirkung gegenüber *C. krusei* (IC₅₀ = 285 µg/mL). Gleichzeitig, wurde für EDA-AC₁₈₅₈ mit 626 µg/mL der höchste IC₅₀-Wert für *C. albicans* berechnet. EDA-AC₄₅₄ tötete die Hälfte der *C. albicans* und *C. krusei* erst ab einer AC Konzentration von etwa 590 µg/mL. *C. glabrata* wurde hingegen schon ab einer AC Konzentration von 350 µg/mL gehemmt.

EDA-AC₁₈₅₈ könnte für die weitere Untersuchung auf *C. krusei* interessant sein. Auch in der Überprüfung reagierte *C. krusei* am sensibelsten auf EDA-AC₁₈₅₈ unter den drei *Candida spp.*.

Durchschnittlich zeigten die AC mit niedrigem Polymerisationsgrad und hohem Substitutionsgrad in der LM effektivere hemmende Eigenschaften. Welche der beiden Eigenschaften den größeren Anteil an der antimikrobiellen Wirkung hat, bleibt zu untersuchen. EDA-AC₃₃₀ zeigte mit einem niedrigen Polymerisationsgrad und dem niedrigsten Substitutions-

grad eine hemmende Wirkung, die im mittleren Bereich liegt. EDA-AC₁₈₅₈, mit dem höchsten Polymerisations- und hohen Substitutionsgrad, zeigte eine geringe hemmende Wirkung (Ausnahme *C. krusei*). EDA-AC₄₅₄ wies mit einem mittleren Polymerisationsgrad und mittleren Substitutionsgrad durchschnittlich die ineffektivste Hemmung auf (Abb. 6.8).

Als neu entwickeltes und synthetisch hergestelltes Polyampholyt konnte, die AC neben einer beschriebenen antibakteriellen und einer antithrombogenen Eigenschaft, in dieser Arbeit eine ausgeprägte antimykotische Wirkung gegenüber nosokomial relevanten Hefen verdeutlichen (Genco 2012, Genco, Zemljič et al. 2012, Zieger, Wurlitzer et al. 2015).

In einer Hämkompatibilitätsstudie von Zieger et al. zeigte sich, dass AC mit hohen DS_{EDA}-Werten vielversprechende antithrombogene, für den medizinischen Bereich relevante, Eigenschaften besitzen (Zieger, Wurlitzer et al. 2015). Wie auch in dieser Studie rückten AC mit hohen DS_{amin}-Werten in den Fokus und weckten Interesse für weitere Untersuchungen.

Der antimikrobielle Wirkmechanismus der AC ist bisher noch nicht vollständig bekannt. Jedoch wurde aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu Chitosan, einem Polyaminosaccharid, und dessen antimikrobiellen Wirkung, ein ähnlicher Wirkmechanismus hinter der antimikrobiellen Eigenschaft der AC vermutete (Genco, Zemljič et al. 2012). Chitosan wird mittels Deacetylierung aus Chitin gewonnen, welches einen festen Bestandteil von Krustaceae und Pilzen bildet (Seyfarth, Schliemann et al. 2008, Hof und Dörries 2014).

Es wird vermutet, dass die nach außen hin negativ geladene mikrobielle Zellwand von z. B. *Candida spp.* mit den positiv geladenen Ammoniumgruppen der AC interagiert. Aufgrund dieser unspezifischen elektrostatischen Wechselwirkung entsteht eine Veränderung in der Zellwand. Durch eine hieraus resultierende osmotische Dysbalance des Zellinneren, folgt eine Inhibition mikrobiellen Wachstums (Genco, Zemljič et al. 2012, Shibata, Kobayashi et al. 2012, Wiegand, Nikolajski et al. 2015).

Die antimikrobielle Eigenschaft von AC auf Bakterien und Hefen ist bekannt, jedoch wurde sie bislang nur unzureichend untersucht (Genco, Zemljič et al. 2012). In wieweit der unterschiedliche Aufbau von Hefe- und Bakterienzellwänden bzw. Zellmembranen Einfluss auf die Effektivität der AC nimmt bleibt zu untersuchen (Hof und Dörries 2014). Je-

doch lässt der vermutete Wirkmechanismus der AC Raum für Theorien (Genco, Zemljič et al. 2012). Der Einfluss von „high- and low- molecular Chitosan Hydrochlorid“ wurde von F. Seyfarth et al. auf Hefen, sowie in der Dissertation von Kehr 2007 auf Bakterien untersucht. Im Vergleich beider Arbeiten stellte sich Fungizität zwischen 0,5% und 1% und bakterizide Wirkung zwischen 0,1% und 0,5% ein (Kehr 2007, Seyfarth, Schliemann et al. 2008). Ein stark ausgeprägter anionischer Charakter einer Zelloberfläche könnte der AC aufgrund ihres polykationischen Charakters (Genco, Zemljič et al. 2012) größere Angriffsfläche bieten als eine Zelloberfläche, mit niedrig ausgeprägtem Charakter. In welchen Konzentrationsbereichen sich AC wachstumshemmend auf klinisch relevante Bakterien speizes auswirkt bleibt zu untersuchen. Finger et al. konnte zeigen, dass die Hemmkonzentration bei Hefen, durch Cyclodextrin-Antiseptika-Komplexe, abhängig von der Dicke der Zellwand ist (Finger, Wiegand et al. 2012).

Chitosane verwenden einen ähnlichen antimikrobiellen Wirkmechanismus (siehe oben). In Bezug auf die Arbeit von Seyfarth et al. sind weitere Parallelen zu dieser Arbeit zu erkennen (siehe oben). Nephelometrisch ermittelte IC_{50} Konzentrationen (0,007 % - 0,03 %) sind etwa hundertmal geringer als durch Ausplattierung (ca. 0,5% - 1%) ermittelte Hemmkonzentrationen. Dies zeigt sich auch in dieser Untersuchung (IC_{50} -MLN 13,5 $\mu\text{g/mL}$ – 95 $\mu\text{g/mL}$; Überprüfung auf SDA-Platten 313 $\mu\text{g/mL}$ - 3125 $\mu\text{g/mL}$). In dieser Arbeit entsprach eine 1%ige AC Konzentration 5000 $\mu\text{g/mL}$. In dieser höchsten AC Konzentration wurden alle *Candida spp.* gehemmt.

Seyfarth et al. konnten mit einer 1 %igen „high- bzw. low- molecular weight chitosan Hydrochlorid“ Lösung eine Hemmung von *C. albicans* sowie *C. krusei* erzielen. *C. glabrata* unterlag in diesem Konzentrationsbereich keiner Hemmung. Aufgrund unterschiedlicher Darstellung der Hemmkonzentrationen sowie unterschiedlicher Testsubstanzen ist ein genauer Vergleich von Hemmkonzentrationen schwierig. Auch der Vergleich der Ergebnisse des verwendeten Fluoreszenztest (Fun® -1 staining) und der in dieser Arbeit verwendeten Luminometrie ist schwierig, da letztere Methode sensitiver ist (Chen und Cushion 1994). Die von Finger et al. nephelometrisch und luminometrisch untersuchte Wirkung von Cyclodextrin-Antiseptika-Komplexe auf *C. albicans* und *M. pachydermatis* ergab IC_{50} Werte zwischen etwa **1 $\mu\text{g/mL}$ und 21,085 $\mu\text{g/mL}$.**

Es handelt sich um ringförmige degradierte Produkte aus Stärke, die sich durch die Anzahl ihrer Glukosemoleküle unterscheiden und z.B. antiseptische Moleküle einschließen können.

Eine verbesserte Wirkung der inkludierten Moleküle soll erreicht werden (z.B. antimikrobielle Wirkung). Die effektivsten antimykotisch wirksamen Substanzen stellten Cyclodextrin-Polyhexanid Komplexe (α -, β -, γ - CD-PHMB- Komplexe) dar. Hier konnten IC_{50} Werte für *C. albicans* von etwa **27 $\mu\text{g/mL}$ – 620 $\mu\text{g/mL}$ (MLN)** und **1,5 $\mu\text{g/mL}$ – 200 $\mu\text{g/mL}$ (LM)** ermittelt werden (Finger, Wiegand et al. 2012). In der vorliegenden Arbeit erstreckten sich die halbmaximalen Konzentrationen auf *C. spp* von **13,5 $\mu\text{g/mL}$ über 95 $\mu\text{g/mL}$ (IC_{50} MLN)** sowie von **145 $\mu\text{g/mL}$ über 626 $\mu\text{g/mL}$ (IC_{50} LM).**

In der Dissertation von Wichert von 2014 wurden mithilfe der MLN vier AC mit identischem Polymerisations- und variierenden, eher geringen Aminierungsgraden auf Hefen und Bakterien untersucht. Dies lässt eine isolierte Betrachtung der antimikrobiellen Wirkung des Aminierungsgraden zu. Hier wurde jedoch kein direkter Zusammenhang von Aminierungsgrad der AC und antimikrobiellem Effekt nachgewiesen. Alle untersuchten AC zeigten jedoch eine antimikrobielle Wirkung. Die ermittelten IC_{50} -Werte der AC für *C. albicans* betrugen zwischen 1,37 $\mu\text{g/mL}$ und 1,58 $\mu\text{g/mL}$. Minimale Hemmkonzentrationen (MIC) zeigten sich zwischen 12,50 $\mu\text{g/mL}$ und 20,83 $\mu\text{g/mL}$. Wichert konnte zeigen, dass *C. albicans* eine halbmaximale Hemmung durch die AC schon in geringen Konzentrationen erfuhr, zur vollständigen Hemmung waren jedoch deutlich höhere Konzentrationen notwendig. Diese Beobachtung bestätigte sich in dieser Arbeit zudem für *C. krusei* und *C. glabrata*. Das eine antimykotische Wirkung der AC in Abhängigkeit der Dicke der Zellwand stehen könnte wurde ebenfalls durch Wichert beobachtet (Finger, Wiegand et al. 2012, Wichert 2015).

Diese Arbeit widmet sich erstmalig der Frage nach der Wirkung von AC verschiedener DS_{amin} und DP_w auf *Candida spp.*.

In den zuletzt aufgeführten Arbeiten (Kehr 2007, Seyfarth, Schliemann et al. 2008, Finger, Wiegand et al. 2012) stellen sich Hemmkonzentrationen dar, die in etwa mit denen der in dieser Arbeit erforschten Hemmkonzentrationen zu vergleichen sind. Um eine exakte Aussage darüber treffen zu können, welche dieser modernen antimikrobiellen Substanzen klinisch relevante Hefen am effektivsten hemmen zu vermögen kann in dieser Arbeit nicht

endgültig untersucht werden. Spezielle dafür angelegte Versuchsaufbauten könnten diese Frage in zukünftigen Untersuchungen beantworten.

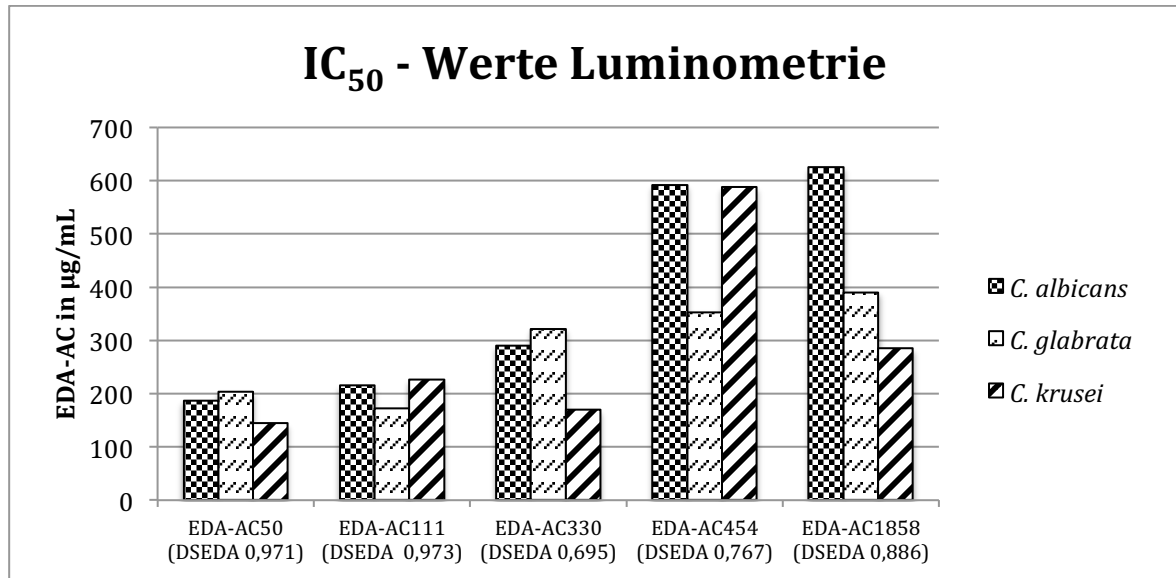


Abb. 6.8 Vergleich der IC₅₀ -Werte anhand der luminometrischen Untersuchungen.

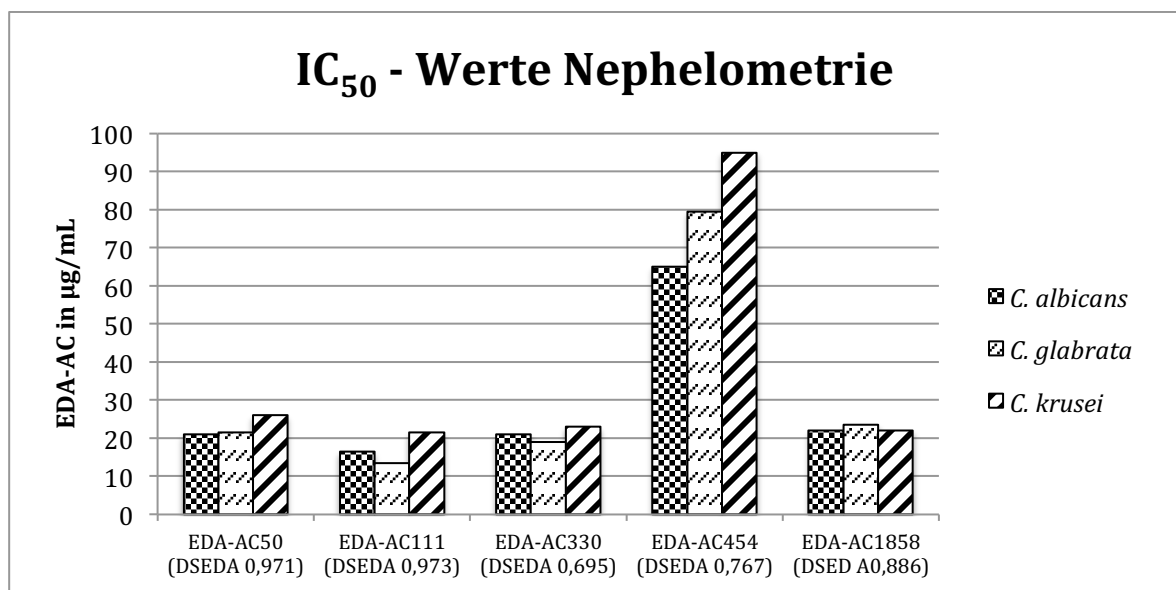


Abb. 6.9 Vergleich der IC₅₀-Werte anhand der nephelometrischen Untersuchungen.

Diskussion

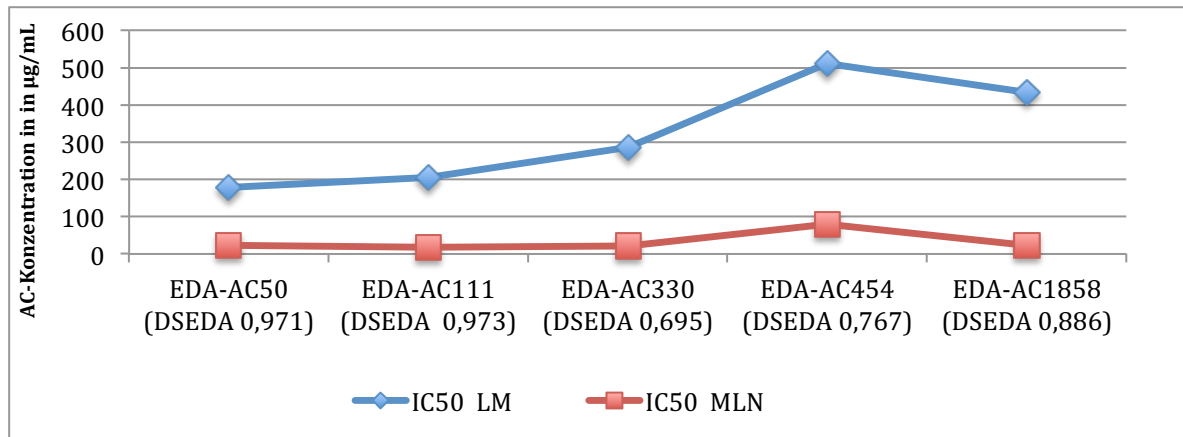


Abb. 6.10 IC₅₀-Mittelwerte aus der Luminometrie und der Mikrotiterplattenlasernephelometrie.

7 Schlussfolgerungen

Die Untersuchungen der Wirkung der AC auf die Hefestämme *C. albicans* (DSM 1386), *C. glabrata* (DSM 11226) und *C. krusei* (ATCC 6258) zeigten, dass die getesteten Aminocellulose fungistate bzw. fungizide Eigenschaften besitzen. Dabei steht die wachstumshemmende Wirkung im direkten Zusammenhang mit der Aminocellulose - Konzentration. Die Mittelwerte der Hemmkonzentrationen beider Messmethoden (Mikrotiterplattenlaser-nephelometrie und Luminometrie) und der Überprüfung durch Ausplattieren weichen, wie die Grafik 7.1 verdeutlicht, voneinander ab. Die hierbei verwendeten Werte repräsentieren den Mittelwert aus allen untersuchten *Candida* Spezies zusammengefasst. In dieser Darstellungsform wird die wachstumshemmende Wirkung der Aminocellulose in Abhängigkeit vom Substitutions (DS_{EDA}) - bzw. Polymerisationsgrad (DP_w) betrachtet (Abb. 7.1; Abb. 7.2). Natürlich reagiert jede einzelne untersuchte *Candida* Spezies individuell unter dem Einfluss der Aminocellulose; diese Darstellung soll einen Überblick über die Tendenz der Aminocellulose - Wirkung ermöglichen.

EDA-AC mit niedrigem Polymerisationsgrad (DP_w) zeigten eine bessere antimikrobielle Wirkung als EDA-AC mit höherem Polymerisationsgrad (DP_w) (Abb. 7.1). Aminocellulose mit hohem Substitutionsgrad (DS_{EDA}) zeigten tendenziell eine bessere hemmende Wirkung auf die Hefen als Aminocellulosen mit niedrigem Substitutionsgrad (DS_{EDA}) (Abb. 7.2)

Ausgehend von dieser Untersuchung ergeben sich lohnenswerte Untersuchungsmöglichkeiten für die Zukunft. EDA-AC₅₀ und EDA-AC₁₁₁ hemmten *C. spp.* effektiv. Die Kombinationen *C. albicans*, *C. krusei* und EDA-AC₁₁₁ sowie *C. glabrata* und EDA-AC₅₀ sind vielversprechend (Abb. 5.31).

Schlussfolgerungen

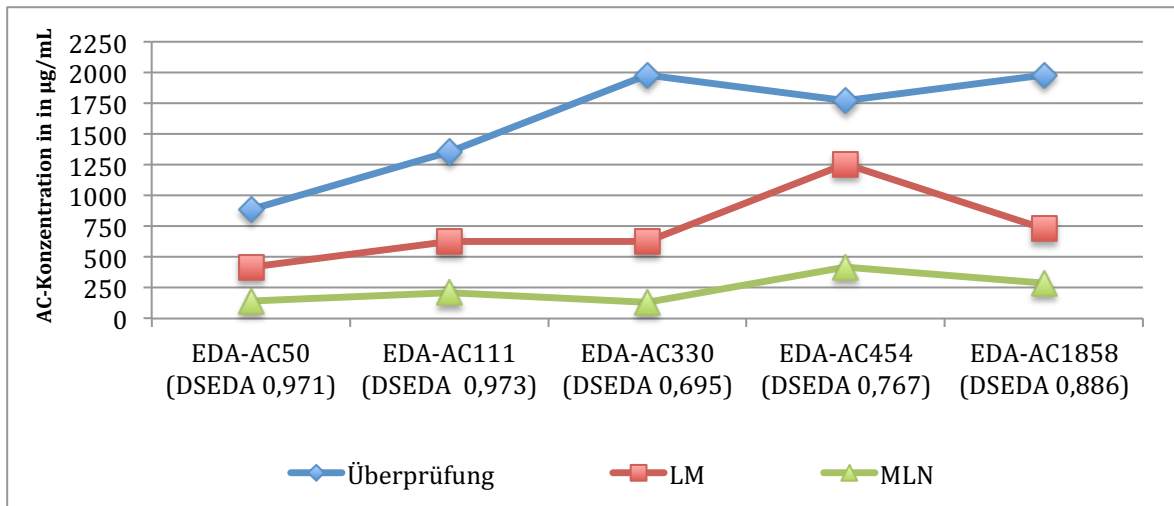


Abb. 7.1 Mittewerte der Hemmkonzentrationen. EDA-AC geordnet nach dem Grad der Polymerisation.

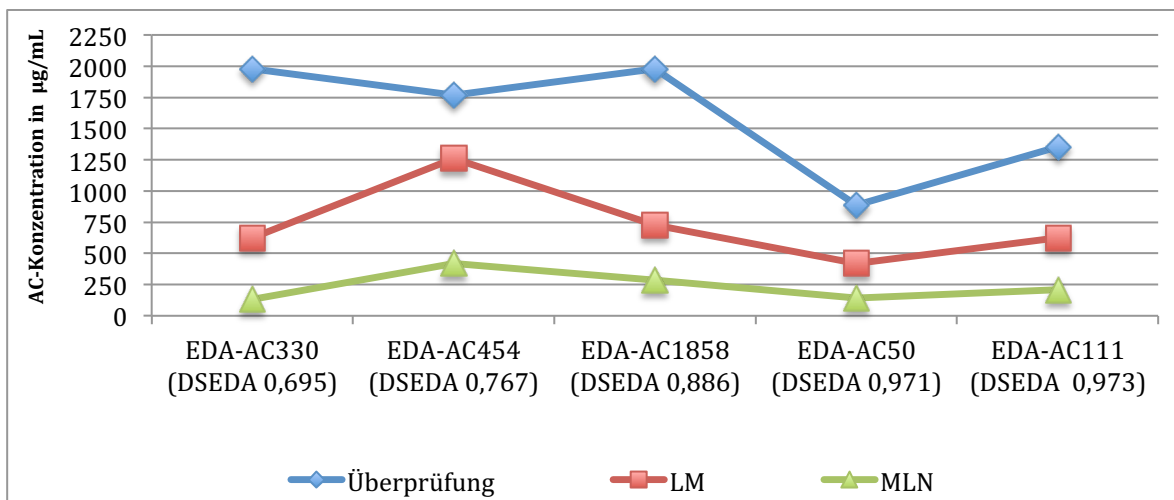


Abb. 7.2 Mittewerte der Hemmkonzentrationen. EDA-AC geordnet nach dem Grad der Funktionalisierung.

Die hemmende Wirkung der Aminocellulose auf andere Mikroorganismen konnte in weiteren, noch nicht veröffentlichten Untersuchungen, im In-vitro-Forschungslabor der Klinik für Hautkrankheiten Jena gezeigt werden.

Cellulose ist als nachwachsender Rohstoff und als Ausgangsmaterial für Aminocellulose in großen Mengen vorhanden. Die Integration von funktionellen Gruppen in das Biopolymer verschafft der Cellulose spezifische Eigenschaften und macht sie vielfältig einsetzbar (Klemm, Heublein et al. 2005).

Für den Menschen ist Cellulose ungiftig und kann ohne die Hilfe von anaeroben Bakterien nicht verdaut werden. Sie ist ein wichtiger pflanzlicher Ballaststoff in der menschlichen Nahrung.

Schlussfolgerungen

Die verwendeten Aminocellulosen jedoch wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht auf Toxizität gegenüber humanen Zellen getestet. In einer anderen Untersuchung wurde, unter dem Aspekt von Wundheilung bzw. Wundmanagement, die Biokompatibilität von Aminocellulosen *in vitro* getestet. Die untersuchten AC besaßen unterschiedlich stark ausgeprägte zytotoxische Eigenschaften. AC mit geringerer Anzahl von Aminogruppen schienen weniger zytotoxisch zu sein (Wiegand, Nikolajski et al. 2015). In der Hämokompatibilitätsstudie von Zieger et al. zeigten AC mit einer geringen Anzahl von Aminogruppen einen gering ausgeprägten antithrombogenen Effekt bei ebenfalls gering ausgeprägter hämolytischer Eigenschaft (Zieger, Wurlitzer et al. 2015).

Die genannten Eigenschaften eröffnen ein breites Spektrum der Anwendungsmöglichkeiten. Denkbar wären Beschichtungen für abiotische Oberflächen im klinischen Bereich, wie z.B. Wundauflagen und Verweilkanülen, um die Bildung von gefährlichen Biofilmen zu minimieren oder zu verhindern. Auch die Suche nach Reservetherapeutika besitzt aufgrund der Zunahme von Resistenzbildungen einen hohen Stellenwert. Nicht zuletzt sind z. B. für die topische Anwendung bei Patienten mit wiederkehrenden Pilzinfektionen der Fußnägel oder in Hygiene- und Kosmetikartikeln (z.B. in Mundspülungen) Einsatzmöglichkeiten denkbar. Der vermutete, unspezifische Wirkmechanismus der Aminocellulosen, erschwert Erregern eine Resistenzentwicklung. Sie sind im Ausblick eine interessante Substanzklasse deren weitere Untersuchung sich lohnt.

8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1 Phylogenetik <i>Candida</i> (Bennett 2010).	6
Abb. 2.2 Mikromorphologie von <i>C. albicans</i> . Es sind Sprosszellen, Myzel und.....	8
doppelwandige Chlamydosporen zu erkennen (Dermatologie Jena).	8
Abb. 2.3 Blastosporen von <i>C. glabrata</i> (Dermatologie Jena).	8
Abb. 2.4 Blastosporen und Pseudohyphe von <i>C. krusei</i> (Dermatologie Jena).	9
Abb. 2.5 Parasexueller Fortpflanzungszyklus von <i>C. albicans</i> zwischen gleichgeschlechtlichen und ungleichgeschlechtlichen Zelltypen. a und α beschreiben unterschiedliche Geschlechtstypen (Bennett 2010).....	11
Abb. 2.6 Elektronenmikroskopisches Bild eines <i>C. albicans</i>	14
Biofilms (Ramage, Saville et al. 2005).....	14
Abb. 2.7 Mechanismus der Invasion von <i>C. albicans</i> in epitheliale	14
Zellen (Zhu und Filler 2010).	14
Abb. 2.8 Expression von Phospholipase B während einer	14
<i>Candida</i> -Infektion im Gastrointestinaltrakt einer Maus (Ghannoum 2000).	14
Abb. 2.9 Struktur eines Cellulosepolymers (Genco 2012).	22
Abb. 2.10 Struktur der Grundeinheit einer Aminocellulose (links) und der funktionellen Gruppe (Ethylendiamin; rechts).	22
Abb. 2.11 Physikochemisches Verhalten von Aminocellulosesulfat-Derivaten, dargestellt als repräsentatives Schema. <i>R-OSO₃⁻</i> An Cellulosepolymer gebundene Sulfatgruppe. <i>R ~ NH₃⁺</i> An Cellulosepolymer gebundene protonierte Aminogruppe a) bei einem pH-Wert >11 sind die Aminogruppen vollständig deprotoniert und die Aminocellulosesulfat-Polymere negativ geladen. b) Das Polymer bei Isoelektrischem Punkt (pH ~9.7 BAECs und ~4.7 AECS). c) Die Aminogruppen sind vollständig protoniert bei pH <3 und das ACS Polymer ist positiv geladen (Genco 2012).	23
Abb. 4.1 Schema der Beschickung einer Mikrotiterplatte am Beispiel von <i>C.</i> <i>albicans</i>	29
Abb. 4.2 Mikrotiterplatten-Lasernephelometer „NEPHELOstar Galaxy“ (BMG LABTECH).	30
Abb. 4.3 Laser des Nephelometers.	30

Abbildungsverzeichnis

Abb. 4.4 Funktionsprinzip eines Nephelometers (Hipler et al. 2003).	30
Abb. 4.5 Luminometer „LUMIstar Omega“ (BMG LABTECH).	32
Abb. 4.6 Reaktionsgleichung des ATP-Biolumineszenz-Assay (Promega).....	32
Abb. 4.7 Schema der Beschickung einer Mikrotiterplatte. Rot markiert die Probenentnahme	33
zur Überimpfung und Anzucht auf SDA-Agarplatten nach 24 h nephelometrischer Messung.	33
Abb. 5.1 Nephelometrische Untersuchung von <i>C. albicans</i> unter dem Einfluss der EDA-AC ₅₀	35
Abb. 5.2 Luminometrische Untersuchung von <i>C. albicans</i> unter dem Einfluss der EDA-AC ₅₀	35
Abb. 5.3 Nephelometrische Untersuchung von <i>C. albicans</i> unter dem Einfluss der EDA-AC ₁₁₁	36
Abb. 5.4 Luminometrische Untersuchung von <i>C. albicans</i> unter dem Einfluss der EDA-AC ₁₁₁	36
Abb. 5.5 Nephelometrische Untersuchung von <i>C. albicans</i> unter dem Einfluss der EDA-AC ₃₃₀	37
Abb. 5.6 Luminometrische Untersuchung von <i>C. albicans</i> unter dem Einfluss der EDA-AC ₃₃₀	37
Abb. 5.7 Untersuchung von <i>C. albicans</i> unter dem Einfluss der EDA-AC ₄₅₄	38
Abb. 5.8 Luminometrische Untersuchung von <i>C. albicans</i> unter dem Einfluss der EDA-AC ₄₅₄	39
Abb. 5.9 Nephelometrische Untersuchung von <i>C. albicans</i> unter dem Einfluss der EDA-AC ₁₈₅₈	40
Abb. 5.10 Luminometrische Untersuchung von <i>C. albicans</i> unter dem Einfluss der EDA-AC ₁₈₅₈	40
Abb. 5.11 Nephelometrische Untersuchung von <i>C. glabrata</i> unter dem Einfluss der EDA-AC ₅₀	41
Abb. 5.12 Luminometrische Untersuchung von <i>C. glabrata</i> unter dem Einfluss der EDA-AC ₅₀	41
Abb. 5.13 Nephelometrische Untersuchung von <i>C. glabrata</i> unter dem Einfluss der EDA-AC ₁₁₁	42

Abbildungsverzeichnis

Abb. 5.14 Luminometrische Untersuchung von <i>C. glabrata</i> unter dem Einfluss der EDA-AC ₁₁₁	42
Abb. 5.15 Nephelometrische Untersuchung von <i>C. glabrata</i> unter dem Einfluss der EDA-AC ₃₃₀	43
Abb. 5.16 Luminometrische Untersuchung von <i>C. glabrata</i> unter dem Einfluss der EDA-AC ₃₃₀	43
Abb. 5.17 Nephelometrische Untersuchung von <i>C. glabrata</i> unter dem Einfluss der EDA-AC ₄₅₄	44
Abb. 5.18 Luminometrische Untersuchung von <i>C. glabrata</i> unter dem Einfluss der EDA-AC ₄₅₄	44
Abb. 5.19 Nephelometrische Untersuchung von <i>C. glabrata</i> unter dem Einfluss der EDA-AC ₁₈₅₈	45
Abb. 5.20 Luminometrische Untersuchung von <i>C. glabrata</i> unter dem Einfluss der EDA-AC ₁₈₅₈	45
Abb. 5.21 Nephelometrische Untersuchung von <i>C. krusei</i> unter dem Einfluss der EDA-AC ₅₀	46
Abb. 5.22 Luminometrische Untersuchung von <i>C. krusei</i> unter dem Einfluss der EDA-AC ₅₀	46
Abb. 5.23 Nephelometrische Untersuchung von <i>C. krusei</i> unter dem Einfluss der EDA-AC ₁₁₁	47
Abb. 5.24 Luminometrische Untersuchung von <i>C. krusei</i> unter dem Einfluss der EDA-AC ₁₁₁	47
Abb. 5.25 Nephelometrische Untersuchung von <i>C. krusei</i> unter dem Einfluss der EDA-AC ₃₃₀	48
Abb. 5.26 Luminometrische Untersuchung von <i>C. krusei</i> unter dem Einfluss der EDA-AC ₃₃₀	48
Abb. 5.27 Nephelometrische Untersuchung von <i>C. krusei</i> unter dem Einfluss der EDA-AC ₄₅₄	49
Abb. 5.28 Luminometrische Untersuchung von <i>C. krusei</i> unter dem Einfluss der EDA-AC ₄₅₄	49
Abb. 5.29 Nephelometrische Untersuchung von <i>C. krusei</i> unter dem Einfluss der EDA-AC ₁₈₅₈	50

Tabellenverzeichnis

Abb. 5.30 Luminometrische Untersuchung von <i>C. krusei</i> unter dem Einfluss der EDA-AC ₁₈₅₈ .	50
Abb. 5. 31 Vergleich der fungiziden AC-Konzentrationen (Angabe der Mittelwerte in µg/mL).	54
Abb. 6.1 <i>C. albicans</i> luminometrische Messung 1	57
Abb. 6.2 <i>C. albicans</i> luminometrische Messung 2	57
Abb. 6.3 <i>C. glabrata</i> luminometrische Messung 1	59
Abb. 6.4 <i>C. glabrata</i> luminometrische Messung 2	59
Abb. 6.5 ATP-Standartkurve <i>C. albicans</i> LM EDA-AC ₁₁₁ (y-Achse Relative Luminometereinheiten (RLU); x-Achse ATP Gehalt in nM).	60
Abb. 6.6 <i>C. krusei</i> EDA-AC ₅₀ . Beispiel für einen ATP- Anstieg.	62
Abb. 6.7 Auszug Rohdaten Mikrotiterplattenlasernephelometrie.	63
Abb. 6.8 Vergleich der IC ₅₀ -Werte anhand der luminometrischen Untersuchungen.	69
Abb. 6.9 Vergleich der IC ₅₀ -Werte anhand der nephelometrischen Untersuchungen.	69
Abb. 6.10 IC ₅₀ -Mittelwerte aus der Luminometrie und der Mikrotiterplattenlasernephelometrie.	70
Abb. 7.1 Mittewerte der Hemmkonzentrationen. EDA-AC geordnet nach dem Grad der Polymerisation.	72
Abb. 7.2 Mittewerte der Hemmkonzentrationen. EDA-AC geordnet nach dem Grad der Funktionalisierung.	72

9 Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Systematik der Pilze, Einordnung <i>Candida</i> (Dörfelt und Jetschke 2001)	5
Tab. 2 Übersicht über Antimykotika (in Anlehnung an (Karow und Lang-Roth 2010, Parrillo und Dellinger 2013).	20
Tab. 3 Übersicht über verwendete Verbrauchsmaterialien, Geräte, Chemikalien und Software.	25
Tab. 4 Übersicht über die getesteten Aminocellulosen.	27
Tab. 5 Dosis-Wirkungs-Kurven für EDA-AC ₄₅₄ .	52

Tabellenverzeichnis

Tab. 6 Übersicht der ermittelten IC ₅₀ -Werte (Angabe der Werte in µg/mL).	53
Tab. 7 Zusammenfassung der fungiziden AC-Konzentrationen (Angabe der Mittelwerte in µg/mL).	54

10 Literaturverzeichnis

Abeck, D., J. Brasch, O. A. Cornely, I. Effendy, W. Fegeler, G. Ginter-Hanselmayer, N. Haake, G. Hamm, C. U. Hipler, H. Hof, H. C. Korting, P. Mayser, M. Ruhnke, K. H. Schlacke, C. Seebacher und H. J. Tietz (2008). "Orale Candidose AWMF online."

Abeck, D., J. Brasch, I. Effendy, W. Fegeler, G. Ginter-Hanselmayer, N. Haake, G. Hamm, H. Hof, H. C. Korting, P. Mayser, M. Ruhnke, K. H. Schlacke, C. Seebacher und H. J. Tietz (2005). "AWMF online - Leitlinie Dermatologie/Mykologie: Candidose der Haut."

Achkar, J. M. und B. C. Fries (2010). "Candida infections of the genitourinary tract." Clin Microbiol Rev **23**(2): 253-273.

Almirante, B., D. Rodriguez, B. J. Park, M. Cuenca-Estrella, A. M. Planes, M. Almela, J. Mensa, F. Sanchez, J. Ayats, M. Gimenez, P. Saballs, S. K. Fridkin, J. Morgan, J. L. Rodriguez-Tudela, D. W. Warnock, A. Pahissa und G. Barcelona Candidemia Project Study (2005). "Epidemiology and predictors of mortality in cases of Candida bloodstream infection: results from population-based surveillance, barcelona, Spain, from 2002 to 2003." J Clin Microbiol **43**(4): 1829-1835.

Anaissie, E. J., M. R. McGinnis und M. A. Pfaller (2009). Clinical Mycology.

Arendrup, M. C. (2010). "Epidemiology of invasive candidiasis." Curr Opin Crit Care **16**(5): 445-452.

Arendrup, M. C. (2013). "Candida and candidaemia. Susceptibility and epidemiology." Dan Med J **60**(11): B4698.

Baillie, G. S. und L. J. Douglas (1999). "Role of dimorphism in the development of Candida albicans biofilms." J Med Microbiol **48**(7): 671-679.

Bennett, R. J. (2010). "Coming of age--sexual reproduction in *Candida* species." *PLoS Pathog* **6**(12): e1001155.

Bennett, R. J. und A. D. Johnson (2005). "Mating in *Candida albicans* and the search for a sexual cycle." *Annu Rev Microbiol* **59**: 233-255.

Bevan, C. D. und R. S. Lloyd (2000). "A high-throughput screening method for the determination of aqueous drug solubility using laser nephelometry in microtiter plates." *Anal Chem* **72**(8): 1781-1787.

Bodenschatz, W. (2006). "Kompaktwissen Desinfektion: Das Handbuch für Ausbildung und Praxis." **3**: 32-32.

Chen, F. und M. T. Cushion (1994). "Use of an ATP bioluminescent assay to evaluate viability of *Pneumocystis carinii* from rats." *J Clin Microbiol* **32**(11): 2791-2800.

Chen, F. und M. T. Cushion (1994). " Use of an ATP bioluminescent assay to evaluate viability of *Pneumocystis carinii* from rats. ." *Journal of Clinical Microbiology*, 32(11), 2791–2800.

Chibana, H., N. Oka, H. Nakayama, T. Aoyama, B. B. Magee, P. T. Magee und Y. Mikami (2005). "Sequence finishing and gene mapping for *Candida albicans* chromosome 7 and syntenic analysis against the *Saccharomyces cerevisiae* genome." *Genetics* **170**(4): 1525-1537.

Colombo, A. L., T. Guimaraes, L. R. Silva, L. P. de Almeida Monfardini, A. K. Cunha, P. Rady, T. Alves und R. C. Rosas (2007). "Prospective observational study of candidemia in Sao Paulo, Brazil: incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality." *Infect Control Hosp Epidemiol* **28**(5): 570-576.

Cuellar-Cruz, M., A. Vega-Gonzalez, B. Mendoza-Novelo, E. Lopez-Romero, E. Ruiz-Baca, M. A. Quintanar-Escorza und J. C. Villagomez-Castro (2012). "The effect of biomaterials and antifungals on biofilm formation by *Candida* species: a review." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **31**(10): 2513-2527.

Doi, M., M. Homma, A. Chindamporn und K. Tanaka (1992). "Estimation of chromosome number and size by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) in medically important *Candida* species." *J Gen Microbiol* **138**(10): 2243-2251.

Dörfelt, H. und G. Jetschke (2001). *Wörterbuch der Mykologie*.

Douglas, L. M., H. X. Wang, S. Keppler-Ross, N. Dean und J. B. Konopka (2012). "Sur7 promotes plasma membrane organization and is needed for resistance to stressful conditions and to the invasive growth and virulence of *Candida albicans*." *MBio* **3**(1): 1-12.

Ene, I. V., C. J. Heilmann, A. G. Sorgo, L. A. Walker, C. G. de Koster, C. A. Munro, F. M. Klis und A. J. Brown (2012). "Carbon source-induced reprogramming of the cell wall proteome and secretome modulates the adherence and drug resistance of the fungal pathogen *Candida albicans*." *Proteomics* **12**(21): 3164-3179.

Finger, S., C. Wiegand, H. J. Buschmann und U. C. Hipler (2012). "Antimicrobial properties of cyclodextrin-antiseptics-complexes determined by microplate laser nephelometry and ATP bioluminescence assay." *Int J Pharm* **436**(1-2): 851-856.

Fouda, M. M., D. Knittel, U. C. Hipler, P. Elsner und E. Schollmeyer (2006). "Antimycotic influence of beta-cyclodextrin complexes--in vitro measurements using laser nephelometry in microtiter plates." *Int J Pharm* **311**(1-2): 113-121.

Genco, T. (2012). "Amino cellulose sulfate: synthesis, characterization and physicochemical behavior".

- Genco, T., L. F. Zemljič, M. Bračič, K. Stana-Kleinschek und T. Heinze (2012). "Physicochemical properties and bioactivity of a novel class of cellulose: 6-deoxy-6-amino cellulose sulfate " *Macromolecular Chemistry and Physics*. 213: 539-548.: 1-4.
- Ghannoum, M. A. (2000). "Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis." *Clin Microbiol Rev* **13**(1): 122-143, table of contents.
- Hahn, H., D. Falke, S. H. E. Kaufmann und U. Ullmann (2004). *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*.
- Hipler, B., S. Brand, S. Angersbach und C. Rückert (2003). "Monitoring des Wachstums von Mikroorganismen mit Hilfe der Nephelometrie." *BIOspektrum* 5/03 BMG Labtechnologies GmbH, Offenburg, Lehrstuhl für Genetik, Universität Bielefeld **9**: 648-649.
- Hof, H. und R. Dörries (2009). *Duale Reihe Medizinische Mikrobiologie*.
- Hof, H. und R. Dörries (2014). *Medizinische Mikrobiologie [Virologie, Bakteriologie, Mykologie, Parasitologie, Immunologie, klinische Infektiologie, Hygiene]* Stuttgart, Thieme.
- Horisberger, M. und M. F. Clerc (1988). "Ultrastructural localization of anionic sites on the surface of yeast, hyphal and germ-tube forming cells of *Candida albicans*." *Eur J Cell Biol* **46**(3): 444-452.
- Hube, B. (2004). "From commensal to pathogen: stage- and tissue-specific gene expression of *Candida albicans*." *Curr Opin Microbiol* **7**(4): 336-341.
- Joubert, A., B. Calmes, R. Berruyer, M. Pihet, J. P. Bouchara, P. Simoneau und T. Guillemette (2010). "Laser nephelometry applied in an automated microplate system to study filamentous fungus growth." *Biotechniques* **48**(5): 399-404.

Kanafani, Z. A. und J. R. Perfect (2008). "Antimicrobial resistance: resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact." Clin Infect Dis **46**(1): 120-128.

Karow, T. und R. Lang-Roth (2010). Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie. .

Kehr, F. (2007). "Untersuchung zum Einfluss von verschiedenen Chitosanen auf Staphylococcus aureus und Escherichia coli mit Hilfe eines Mikroplattennephelometers." Dissertation.

Kim, J. und P. Sudbery (2011). "Candida albicans, a major human fungal pathogen." J Microbiol **49**(2): 171-177.

Klemm, D., B. Heublein, H. P. Fink und A. Bohn (2005). "Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material." Angew Chem Int Ed Engl **44**(22): 3358-3393.

Kresken, M., B. Körber-Irrgang und Reinbach (2015). "Epidemiologie und Resistenzsituation bei invasiven Candida-Isolaten." Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. - <http://www.p-e-g.org>.

Lafond, M., N. Vidal, Y. Letourneux und J. M. Brunel (2010). "A comparison of three rapid and accurate bioluminescent antibiotic susceptibility tests." J Pharmacol Toxicol Methods **61**(1): 16-19.

Li, X., Z. Yan und J. Xu (2003). "Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of Candida albicans." Microbiology **149**(Pt 2): 353-362.

Logue, M. E., S. Wong, K. H. Wolfe und G. Butler (2005). "A genome sequence survey shows that the pathogenic yeast Candida parapsilosis has a defective MTL α 1 allele at its mating type locus." Eukaryot Cell **4**(6): 1009-1017.

Mane, A., A. Kulkarni und A. Risbud (2013). "Biofilm production in oral *Candida* isolates from HIV-positive individuals from Pune, India." *Mycoses* **56**(2): 182-186.

Marques, S. M. und J. C. G. Esteves da Silva (2009). "Firefly bioluminescence: A mechanistic approach of luciferase catalyzed reactions. *IUBMB Life*, 61: 6–17. doi: 10.1002/iub.134." *IUBMB Life*, 61: 6–17. doi: 10.1002/iub.134.

Mayer, F. L., D. Wilson, I. D. Jacobsen, P. Miramon, S. Slesiona, I. M. Bohovych, A. J. Brown und B. Hube (2012). "Small but crucial: the novel small heat shock protein Hsp21 mediates stress adaptation and virulence in *Candida albicans*." *PLoS One* **7**(6): e38584.

Mempin, R., H. Tran, C. Chen, H. Gong, K. Kim Ho und S. Lu (2013). "Release of extracellular ATP by bacteria during growth." *BMC Microbiology* **13**(1): 1-13.

Mylonas, I., W. Mendling, K. Friese, E. R. Weissenbacher, J. Brasch, M. Schaller, P. Mayser, I. Effendy, G. Ginter-Hanselmayer, H. Hof, O. A. Cornely und M. Ruhnke (2013). "Leitlinie - Die Vulvovaginalkandidose " AWMF online 015/072 – S2k-Leitlinie: Vulvovaginalkandidose.

Pappas, P. G., C. A. Kauffman, D. Andes, D. K. Benjamin, Jr., T. F. Calandra, J. E. Edwards, Jr., S. G. Filler, J. F. Fisher, B. J. Kullberg, L. Ostrosky-Zeichner, A. C. Reboli, J. H. Rex, T. J. Walsh, J. D. Sobel und A. Infectious Diseases Society of (2009). "Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America." *Clin Infect Dis* **48**(5): 503-535.

Parrillo, J. E. und R. P. Dellinger (2013). *Critical care medicine principles of diagnosis and management in the adult*: 1 online resource (xx, 1447 pages).

Payen, A. (1838). "Mémoire sur la composition du tissu propre des plantes et du ligneux." *Comptes Rendus* **7**: 1052-1056.

Perlroth, J., B. Choi und B. Spellberg (2007). "Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment." *Med Mycol* **45**(4): 321-346.

Peskett, G. L. (1927). "Studies on the Growth of Yeast: A Nephelometric Method of Counting Yeast Suspensions." *Biochem J* **21**(3): 460-466.

Peter, M. G. (1995). "Applications and Environmental Aspects of Chitin and Chitosan " *J.M.S.-PURE APPL. CHEM.*, A32(4), pp. 629-640

Pfaller, M. A. (2012). "Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment." *Am J Med* **125**(1 Suppl): S3-13.

Pfaller, M. A., D. R. Andes, D. J. Diekema, D. L. Horn, A. C. Reboli, C. Rotstein, B. Franks und N. E. Azie (2014). "Epidemiology and outcomes of invasive candidiasis due to non-albicans species of *Candida* in 2,496 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH) registry 2004-2008." *PLoS One* **9**(7): e101510.

Pfaller, M. A. und D. J. Diekema (2007). "Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem." *Clin Microbiol Rev* **20**(1): 133-163.

Pfaller, M. A., S. A. Messer, A. Houston, M. S. Rangel-Frausto, T. Wiblin, H. M. Blumberg, J. E. Edwards, W. Jarvis, M. A. Martin, H. C. Neu, L. Saiman, J. E. Patterson, J. C. Dibb, C. M. Roldan, M. G. Rinaldi und R. P. Wenzel (1998). "National epidemiology of mycoses survey: a multicenter study of strain variation and antifungal susceptibility among isolates of *Candida* species." *Diagn Microbiol Infect Dis* **31**(1): 289-296.

Porman, A. M., K. Alby, M. P. Hirakawa und R. J. Bennett (2011). "Discovery of a phenotypic switch regulating sexual mating in the opportunistic fungal pathogen *Candida tropicalis*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(52): 21158-21163.

Promega (2012). "BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay."
<http://www.promega.com>.

Ramage, G., S. P. Saville, D. P. Thomas und J. L. Lopez-Ribot (2005). "Candida biofilms: an update." *Eukaryot Cell* **4**(4): 633-638.

Romanowski, K., A. Zaborin, V. Valuckaite, R. J. Rolfes, T. Babrowski, C. Bethel, A. Olivas, O. Zaborina und J. C. Alverdy (2012). "Candida albicans isolates from the gut of critically ill patients respond to phosphate limitation by expressing filaments and a lethal phenotype." *PLoS One* **7**(1): e30119.

Sardi, J. C., L. Scorzoni, T. Bernardi, A. M. Fusco-Almeida und M. J. Mendes Giannini (2013). "Candida species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options." *J Med Microbiol* **62**(Pt 1): 10-24.

Seebacher, C. und R. B. Hellmessen (1990). "Mycosen Epidemiologie,Diagnosik, Therapie." Gustav Fischer Verlag Jena: 14.

Seyfarth, F., S. Schliemann, P. Elsner und U. C. Hipler (2008). "Antifungal effect of high- and low-molecular-weight chitosan hydrochloride, carboxymethyl chitosan, chitosan oligosaccharide and N-acetyl-D-glucosamine against Candida albicans, Candida krusei and Candida glabrata." *Int J Pharm* **353**(1-2): 139-148.

Shibata, N., H. Kobayashi und S. Suzuki (2012). "Immunochemistry of pathogenic yeast, Candida species, focusing on mannan." *Proceedings of the Japan Academy, Series B* **88**(6): 250-265.

Silva, S., M. Negri, M. Henriques, R. Oliveira, D. W. Williams und J. Azeredo (2012). "Candida glabrata, Candida parapsilosis and Candida tropicalis: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance." *FEMS Microbiol Rev* **36**(2): 288-305.

Staib, P. und J. Morschhauser (2007). "Chlamydospore formation in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*--an enigmatic developmental programme." *Mycoses* **50**(1): 1-12.

Sugiyama, J., T. Okano, H. Yamamoto und F. Horii (1990). "Transformation of Valonia cellulose crystals by an alkaline hydrothermal treatment." *Macromolecules* **23**(12): 3196-3198.

Tarchevskiĭ, I. A. und G. N. Marchenko (1991). *Cellulose: biosynthesis and structure* Cellulose Springer-Verlag.

Tortorano, A. M., C. Kibbler, J. Peman, H. Bernhardt, L. Klingspor und R. Grillot (2006). "Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance." *Int J Antimicrob Agents* **27**(5): 359-366.

Tscherner, M., T. Schwarzmüller und K. Kuchler (2011). "Pathogenesis and Antifungal Drug Resistance of the Human Fungal Pathogen *Candida glabrata*. ." *Pharmaceuticals*. 2011;4(1):169-186. doi:10.3390/ph4010169.

Verstrepen, K. J. und F. M. Klis (2006). "Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts." *Mol Microbiol* **60**(1): 5-15.

White, T. C., K. A. Marr und R. A. Bowden (1998). "Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance." *Clin Microbiol Rev* **11**(2): 382-402.

Wichert, S. (2015). "Untersuchungen der antimikrobiellen Wirkung von Aminocellulosen anhand ihres Aminierungsgrades " Dissertation. Friedrich Schiller Universitätsklinikum

Wiegand, C., M. Nikolajski, U. C. Hipler und T. Heinze (2015). "Nanoparticle Formulation of AEA and BAEA Cellulose Carbamates Increases Biocompatibility and Antimicrobial Activity." *Macromol Biosci* **15**(9): 1242-1251.

Yapar, N. (2014). "Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis." *Ther Clin Risk Manag* **10**: 95-105.

Zhu, W. und S. G. Filler (2010). "Interactions of *Candida albicans* with epithelial cells." *Cell Microbiol* **12**(3): 273-282.

Zieger, M., M. Wurlitzer, C. Wiegand, K. Reddersen, S. Finger, P. Elsner, P. Laudeley, T. Liebert, T. Heinze und U. C. Hipler (2015). "6-Deoxy-6-aminoethyleneamino cellulose: synthesis and study of hemocompatibility." *J Biomater Sci Polym Ed* **26**(14): 931-946.

11.2 Danksagung

Meinen Dank spreche ich zu allererst meiner Mutter, Frau Dr. Carola Schürmann, aus. Der lange Weg von der Hochschulreife über das Studium der Humanmedizin bis hin zur Anfertigung einer Promotionsarbeit war ausschließlich durch Ihren liebevollen Rückhalt und ihre Stärke möglich. Danke.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mir mit Rat und Tat beiseite standen: meine Familie und meine Freunde.

Diese Arbeit ist nicht zuletzt, durch die Hilfe von Frau PD Dr. rer. nat. et med. habil. Uta-Christina Hipler und die tatkräftige, kompetente Unterstützung von Frau Dipl.-Biol. Susanne Finger entstanden. Vielen Dank.

11.4 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Frau Dipl. Biol. Susanne Finger und Frau Dr. rer. nat. et med. habil. Uta-Christina Hipler,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Schwielowsee, den 14.03.2017

Ort ,Datum

Unterschrift des Verfassers